

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Georges BEAUD

1^{re} THÈSE

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ET POUVOIR ONCOGÈNE
DE DIFFÉRENTES SOUCHES D'*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*
Smith et Town) Conn

2^e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 15 Décembre 1965 devant la Commission d'examen

MM. HELLER	Président
SCHAEFFER . . .	} Examinateurs
KEPES.	
MANIGAULT . .	

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Georges BEAUD

1^{re} THÈSE

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ET POUVOIR ONCOGÈNE
DE DIFFÉRENTES SOUCHES D'*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*
(Smith et Town) Conn

2^e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

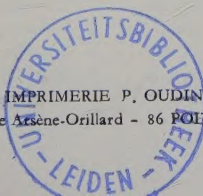
Soutenues le 15 Décembre 1965 devant la Commission d'examen

MM. HELLER *Président*

SCHAEFFER . . . }
KEPES } *Examineurs*
MANIGAULT . . }

IMPRIMERIE P. OUDIN

27, rue Arsène-Orillard - 86 POITIERS



PROFESSEURS

Doyen : M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure
PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
WYART	T Minérale et cristallo
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie végét (Orsay)
AUGER	T Physique quantique et relativité
MONNIER	T Physiologie générale
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique ENS
CARTAN	T Mathématiques ENS
LAFFITTE	T Chimie générale
N...	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du globe
COUSIN (Mlle)	T Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T Chimie minérale
BOCQUET	T Zoologie
KASTLER	T Physique ENS
EPHRUSSI	T Génétique
RIVIERE	T Géologie SPCN et sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
LUCAS R.	T Recherches physiques
THOMAS A.	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
MORAND	T Physique enseignement
SOLEILLET	T Physique PCB
FORTIER	T Mécanique exp. des fluides
DRACH	T Zoologie
QUENEY	T Météo et dynamique atmos.
GALLIEN	T Embryologie
EICHORN	T Botanique
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
CAUCHOIS (Mlle)	T Chimie physique
THELLIER	T Physique du globe
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T Mécanique générale
DU BREIL	T Arith. et théorie des nombres
QUELET	T Chimie organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T Micropaléontologie
JUNG	T Géologie
TRILLAT	T Microscopie et diffraction élec.
WIEMANN	T Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T Théorie physique
AMIEL	T Chimie générale
HOCART	T Minéral et cristal
MATHIEU J-P.	T Physique optique
COUTEAUX	T Cytologie

MAY
 CHOQUET
 FELDMANN
 GUINIER
 JOST
 FORTET

SCHWARTZ
 CHOUARD
 MALAVARD
 NOMANT
 BENARD
 BUVAT
 DUGUE
 SOULAIRAC
 ULRICH
 MARECHAL
 KIRRMANN
 CHADEFAUD
 LE BRETON (Mlle)
 LELONG
 DEVILLERS
 EHRESMANN
 FRANCON
 GLANGEAUD
 DODEMENT
 PISOT
 ROCH
 SCHATZMANN
 TERMIER
 ZAMANSKY
 LENNUIER
 RIZET
 ROUTHIER
 TONNELAT (Mme)
 DIXMIER
 SOUCHAY
 AIGRAIN
 BRUSSET
 LEVY M.

CHAIX (Mme)
 HUREL PY (Mme)
 PANNETIER
 BRUN
 LEDERER
 DUBREIL (Mme)
 LELONG (Mme)
 BELLAIR
 COTTE
 DUBOIS J.-E.
 LAMOTTE
 MICHEL A.
 OLMER
 ROUAULT
 GAUTHIER
 BARCHEWITZ
 BROSEL
 BUSER
 CAMUS
 CASTAING
 CURIEN
 MOYSE
 CHARNIAUX-COTTON (Mme)
 POSSOMPES
 PULLMANN

T Zoologie
 T Théorie des fonctions et topologie
 T Biologie végétale marine
 T Physique des solides (Orsay)
 T Physiologie comparée
 T Calcul des probabilités et physique mathématiques
 T Calcul dif. et intégral
 T Physiologie végétale
 T Aviation (technique aéronautique)
 T Synthèse organique
 T Chimie minérale
 T Botanique ENS
 T Statistique mathématiques
 T Psychophysiologie
 T Physiologie végétale appliquée
 T Optique théo. et appliquée
 T Théories chimiques
 T Botanique
 T Physio de la nutrition
 T Appli de l'anat. géométrie
 T Anatomie et histo. comparée
 T Topologie algébrique
 T Physique SPCN
 T Géo. phys. et géol.
 T Mathématiques MGP
 T Technique math. la physique
 T Géologie
 T Astrophysique
 T Géologie générale
 T Mathématiques générales
 T Physique MGP
 T Génétique (Orsay)
 T Géologie appliquée
 T Physique théorique
 T Mathématiques MPC
 T Chimie générale
 T Electrotech. générale
 T Chimie systématique
 T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
 T Chimie biologique
 T Biologie végétale PCB
 T Chimie générale
 T Mécanique des fluides I
 T Chimie biologique (Orsay)
 T Mathématiques (agrégation)
 T Math. II ENS
 T Géologie SPCN
 T Physique électricité
 T Chimie organique
 T Zoologie ENS
 T Chimie minérale (Orsay)
 T Energétique générale
 T Electricité (Orsay)
 T Mécanique appliquée
 T Chimie physique
 T Physique atomique
 T Physiologie comparée
 T Physio. végétale
 T Physique II thermo (Orsay)
 T Minéralo et cristal.
 T Physio. végét. (Orsay)
 T Evolution des êtres organisés
 T Zoologie
 T Chimie quantique

TEILLAC
 TONNELAT
 VILLE
 WILLEMART
 DODE
 PREYMANN
 GUINOCHE
 ROLLET
 JOSIEN (Mlle)
 CHEVALLEY
 ARNOULT
 CHAPELLE
 DELANGE
 DENY
 GERMAIN
 LUCAS
 ALLARD
 BERTHELOT
 BRICARD
 ALBE FESSARD (Mme)
 FRIEDEL
 JULIA M.
 LENDER
 MAGAT
 QUINTIN (Mlle)
 MONOD
 BENOIT
 DE POSEEL
 CHARLOT
 LEMEE
 GUERIN
 CHATELET
 JEAN
 MATTLER
 BERGERARD
 BERTEIN
 BOUSSIÈRES
 COUTURE (Mme)
 ELLEMBERGER
 FRANC
 SCHNELL
 STLKOWSKI
 ACHER
 BAUDOIN
 BEAUMONT
 BLAMONT
 BOUREAU
 CURIE D.
 DURAND DELGA
 FREON
 HELLER
 TORTRAT
 CAILLEUX
 MAGNAN
 DAUDEL
 FOURCROY (Mlle)
 CHOQUET-BRUHAT (Mme)
 VEIL (Mlle)
 LWOFF
 SIESTRUNCK
 LACOMBE
 BROCHARD
 CABANNES
 LESIEUR

T Physique nuc. et radioactivité (Orsay)
 T Bio physico chim (Orsay)
 T Econométrie
 T Chimie PCB
 T Chimie (Orsay)
 T Recherches physiques
 T Biolo végét. SPCN (Orsay)
 T Chimie minérale
 T Chimie SPCN
 T Géométrie algébrique et théorie des groupes
 T Electronique (Orsay)
 T Physique I (Orsay)
 T Mathématiques I (Orsay)
 T Math. génér. (Orsay)
 T Mécanique théorique des fluides
 T Géologie
 T Chimie physique
 T Physique des partic. fondament. (Orsay)
 T Météor. et phys. de l'at.
 T Psycho physio
 T Physique des solides (Orsay)
 T Etudes des moléculaires complexes
 T Biologie animale SPCN (Orsay)
 T Physico chimie des radio-éléments
 T Electrochimie
 T Chimie du métabolisme
 T Physio animale (Orsay)
 T Analyse numérique
 T Chimie analytique
 T Ecologie végétale (Orsay)
 T Chimie MPC (Orsay)
 T Chimie PCB
 T Physio nucléaire (Orsay)
 T Physique SPCN
 T Zoologie (Orsay)
 T Electronique (Orsay)
 T Radiochimie
 T Thermo et méca physique
 T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
 T Biologie animale PCB
 Botanique tropicale
 T Physiologie végétale
 T Chimie biologique
 T Biologie animale PCB
 Biologie animale SPCN
 Géophysique ionosphère
 T Botanique
 Physique MGP
 T Géologie
 T Chimie organique (Orsay)
 T Physiologie végétale
 T Calcul des probabilités
 T Géologie SPCN
 Physique électricité
 T Mécanique ondulat. appli à la chimie théo et à la phy nucléaire
 Biologie végétale SPCN
 Mécanique analytique et méca céleste
 T Physiologie générale
 T Microbiologie
 T Méca phys. et expérimentale
 T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
 T Physique PCB Orsay
 T Mécanique générale
 T Math. I (Orsay)

MAZET	T Méca géné (Orsay)
CAIRE	Géogra. physique et géo. dynami.
COMOLET	Méca. des fluides
CORABŒUF	T Physio animale (Orsay)
DELLOUE	T Physique de l'exosphère
GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
HOUILLOU	Biologie animale PCB
JULLIEN J.	Chimie SPCN (Orsay)
MALGRANGE	T Technique mathé de la phys. (Orsay)
OLIVIER	Anthropologie
NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T Math. ENS féminines
KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
THIRY	T Méca céleste
ABELES	Physique SPCN
AMAT	T Physique PCB
AUBOIN	T Géologie
BENOIT-GUEUTAL (Mme)	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS	Biologie marine Villefranche-sur-Mer
BRUHAT	T Math MPC
BRUNN	T Géologie historique (Orsay)
CHABRAL	T Physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T Math propé
D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
FURON	T Géologie SPCN
GANS (Mme)	T Génétique
GENEVES	Biologie végétale PCB
GUILBERT	Physique CUS Orléans
HUPE	T Pétrographie
HOLLANDE	T Biologie générale
LIONS	T Analyse numérique
MAITTE	T Chimie PCB
MEYER	Physique propé
NICOLAS	Géologie appliquée
PANIGEL	Biologie générale
RAVIER	Pétrographie
ROSEAU	T Méca théorique des fluides
ROUBINE	Electronique
SILBER	T Chimie PCB
UEBERSFELD	T Electronique
YVON	T Théories physiques
HERVE	T Mathématiques
NERON	T Math MPC (Orsay)
PECKER-WIMEL (Mme)	T Astrophysique
BALKANSKY	Physique MPC
LE CORRE	T Electricité
DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
GOURDIN	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
LEHMANN	T Phys exp des hautes énergies
NATAF	T Physique nucléaires et radioactivité (Orsay)
ECHALIER	Biologie animale PCB
BARRAUD	Physiolo cellulaire
LIOTET	Physiologie végé (Orsay)
DARS	Géologie structurale et géolo appli
CAMEFORT	T Botanique, agrégation
VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
ARNOUS	T Physique théorique
TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
MALLITZIN	T Math propé (Orsay)
GAUDEMAR	Chimie propé

PEREZ Y JORBA
 DAVID
 BROUSSE
 ROSCH
 GUY
 LAZARD
 MOREL Pierre
 ARSAC
 LEFEBVRE
 CHAPEVILLE
 BENOIT
 RIO
 JAUZEIN
 PREVOST Georges
 FAVARD P.
 VILKAS
 FICINI (Mlle)
 LEQUEUX
 COHEN - TANNOUDJI
 TAVERNIER
 ROIZEN (Mme)
 DURAND M
 PASCAUD
 PETIT (Mme)
 BROUSSE
 CAGNIAC
 LEBERRE
 SCHAEFFER
 de GENNES
 RIOU
 CLAUSER
 CHEVALIER
 JANCOVICI
 FALK-VAIRANT
 FETIZON
 CERF
 LURCAT
 RIGAUDY
 SIGWALT
 FOURNET
 COLLONGUES
 DUBERT
 LAVOREL
 MOREL F.
 TALBOT
 NOUGAREDE (Mme)
 FRANÇOIS
 IVANOFF
 CADIOT
 BARUCH
 NOZIERES
 BOK
 SLONIMSKI

Physique Expéri des Hautes énergies
 (Orsay)
 T Chimie (agrégation, Orsay)
 T Mécanique théorique
 T Astronomie
 T Physique expérimentale
 Math MPC
 Physique MPC
 Programmation
 Chimie MPC
 Biochimie
 Physique CPEM
 Chimie CPEM
 Géologie ENS
 BV CPEM
 BA CPEM
 Chimie CPEM
 Chimie CPEM
 Astronomie
 Physique MPC
 Physique CPEM
 Physique CPEM
 BA SPCN
 Physiologie
 BA CPEM
 Géologie (Orsay)
 Physique nucléaire (Orsay)
 Zoologie (Orsay)
 Microbiologie (Orsay)
 Physique des solides (Orsay)
 Physique nuclé exp (Orsay)
 Chimie biolo (Orsay)
 Physio animale (Orsay)
 Physique atomique (Orsay)
 Physique nucléaire (Orsay)
 Chimie propé (Orsay)
 Mathématiques (Orsay)
 Physique
 Chimie SPCN
 Chimie SPCN
 Electricité générale
 Chimie CPEN
 Biochimie
 Biologie physico chimique
 Physiologie comparée
 Génétique chimique
 Botanique
 Zoologie
 Océanographie phys.
 Chimie organique
 Physique propédeutique
 Physique générale
 Physique propédeutique
 Génétique

Le Secrétaire Général :
 R. POULAIN.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
HISTORIQUE	7
I. Notions fondamentales sur la transformation tumorale...	7
II. Mécanismes d'action de la bactérie dans la transformation tumorale	10
III. Biochimie et physiologie de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
TECHNIQUES	23
I. Isolement et caractérisation des souches bactériennes mutantes	24
II. Détermination des activités enzymatiques	27
III. Marquages par les substances radioactives	28
IV. Extraction des acides ribonucléiques	29
V. Evaluations des divisions bactériennes dans la plaie d'inoculation	30
VI. Inoculations des plantes par les bactéries	31

PREMIERE PARTIE

CHAP. I. <i>Division des bactéries dans la plaie d'inoculation...</i>	39
CHAP. II. <i>Etude de la relation entre poids des tumeurs et nombre de bactéries inoculées : Hypothèses sur l'efficacité de la bactérie</i>	43
1° Relation expérimentale obtenue	43
A) Inoculation par les bactéries B6	43
B) Inoculation par les bactéries B6 met ⁻	46
C) Inoculation par les bactéries B6 ileu ⁻ val ⁻	49
D) Discussion	50
2° Hypothèses sur l'efficacité de la bactérie...	51
3° Discussion du chapitre II	56

CHAP. III. <i>Etude des propriétés phytopathogènes des bactéries des souches atténuées</i>	59
1° Inoculation à des tiges de plantes de datura (<i>Datura stramonium</i> L.) et à des explantats primaires de topinambours (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)	59
2° Inoculation des cals auxiniques	62
3° Inoculation mixtes des différentes souches mutantes et tumorigènes	64
4° Discussion du chapitre III	66

DEUXIEME PARTIE

CHAP. I. <i>Propriétés physiologiques des bactéries des souches atténuées cultivées in vitro</i>	71
1° Etude de la croissance	71
2° Production de 3-céto-lactose à partir du lactose	74
3° Production d'AIA à partir du tryptophane.	75
4° Sensibilité à la glycine des souches atténuées et tumorigènes	78
5° Discussion du chapitre I	82
CHAP. II. <i>Solubilisation d'un constituant à renouvellement rapide des bactéries B6 exposées à la glycine.</i>	85
1° Mise en évidence, par marquage au glucose ^{14}C de la solubilisation d'un constituant des bactéries B6	85
2° Marquage par le ^{32}P , l'uracile ^{14}C ou l'adénine ^{14}C du composant étudié	89
3° Evaluation des radioactivités spécifiques des ARN extraits des bactéries marquées ultérieurement exposées ou non à la glycine... ..	91
4° Vitesse de marquage de la fraction étudiée.	94
5° Vitesse de solubilisation de la fraction étudiée	96
6° Action de la glycine sur la synthèse des protéines	97
7° Spécificité et généralité de l'action de la glycine	100
8° Discussion	102

RÉSUMÉ	105
--------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	109
---------------------	-----

INTRODUCTION

On définit la prolifération d'un cancer comme la formation de nouvelles cellules dont la croissance, anarchique et indéfinie, n'obéit plus aux contrôles de l'organisme. Cette transformation des cellules (transformation tumorale) peut être provoquée expérimentalement par différents agents cancérogènes bien définis maintenant dans certains cas de tumeurs animales et végétales.

L'intérêt essentiel que l'on porte aux tumeurs végétales réside plus dans les connaissances fondamentales obtenues sur le mécanisme de la transformation et la physiologie du tissu tumoral que dans l'action phytopathogène de cette maladie. L'étude des tumeurs végétales a initialement pris un aspect particulièrement spectaculaire puisque le premier agent cancérogène identifié dans les deux règnes a été isolé par SMITH et TOWNSEND en 1907 des hyperplasies du collet de la betterave appelées « crown-gall » [148, 149]. L'agent cancérogène est en effet une bactérie dénommée aujourd'hui *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWN.) CONN. Cependant les auteurs de cette découverte qui pensaient que tous les cancers (animaux ou végétaux) étaient des maladies bactériennes, se trompaient comme on le sait maintenant. Bien que les expériences de JENSEN (1910, 1918) [83, 84] montraient l'existence de tumeurs stériles et la possibilité de greffe comme moyen fondamental de l'étude des tissus tumoraux l'intérêt que présentaient les tumeurs provoquées par la bactérie décrut au point que la plupart des auteurs en vinrent à douter de la nature cancéreuse des hyperplasies produites par *Agrobacterium tumefaciens*. Il fallut les travaux de WHITE et BRAUN (1942) [171, 36] pour qu'il soit établi de façon irréfutable que ces hyperplasies sont d'authentiques tumeurs. Ces auteurs montraient en effet, au moyen de la culture de tissu *in vitro*, que le tissu de l'hyperplasie débarrassé des bactéries conserve les propriétés fondamentales du tissu tumoral. Par ailleurs la découverte d'autres facteurs cancérogènes analogues à ceux connus chez les animaux vint renforcer l'analogie entre tumeurs végétales et animales. En

1944 BLACK isole un virus, transmis par un insecte, capable de provoquer la formation de tumeurs chez le trèfle [20]; en 1946, GAUTHERET découvre le phénomène d'anergie : par culture *in vitro* de tissu normal en présence de certaines hormones végétales comme l'acide indolyl-3-acétique (AIA), on peut obtenir du tissu tumoral qui ne requiert plus la présence de ces hormones pour leur développement ultérieur *in vitro* [59]. Cette catégorie de tumeurs ressemble aux cancers obtenus par application sur des tissus animaux de certains produits chimiques (hormones).

En dehors de ces trois catégories de tumeurs, il convient de signaler l'existence des tumeurs portées par certains hybrides de tabac (KOSTOFF, 1930) [99], analogues aux tumeurs apparaissant chez certains hybrides de poissons (GORDON, 1959) [66], et des tumeurs obtenues après irradiation (STEIN *et all.*, 1959, PARTANEN, 1958) [152, 133].

Le travail que nous présentons concerne exclusivement le cas des tumeurs produites par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Les travaux de WHITE et BRAUN ont marqué le point de départ à de nombreuses recherches consacrées à l'étude de l'histologie et de la physiologie du tissu tumoral dont nous n'envisageons dans l'historique suivant que les résultats fondamentaux. Un rappel des connaissances concernant à la fois le rôle de la bactérie dans la formation des tumeurs ainsi que l'ensemble des faits relatifs à la biochimie et la physiologie de cette bactérie précédera la description des techniques et des matériels employés. Dans les résultats nous envisagerons successivement une analyse quantitative de la relation entre poids des tumeurs et nombre de bactéries inoculées ainsi qu'une étude comparative des propriétés phytopathogènes de différents mutants atténués. Dans la dernière partie de ce travail nous avons rassemblé l'ensemble des résultats qui concernent plus particulièrement la physiologie de la bactérie, cultivée *in vitro*.

★★

Ces recherches, réalisées au Service d'Oncologie végétale de l'Institut Pasteur, n'auraient pas été possibles sans les nombreux conseils et le soutien que m'a constamment apporté M. MANIGAULT, Chef de Service. Je lui dois de plus ma vocation scientifique. Je le prie de trouver ici l'expression de ma plus vive gratitude.

J'ai bénéficié d'un soutien matériel considérable grâce à l'autorisation qui m'a été accordée de travailler à l'Institut Pasteur, et grâce aussi à l'aide financière dont j'ai bénéficié en tant qu'Attaché de Recherches au C.N.R.S.

Je tiens à remercier M. le Directeur de l'Institut Pasteur et M. le Directeur du C.N.R.S. qui m'ont ainsi permis de préparer ce travail dans les meilleures conditions.

Toute ma gratitude va à M. BUSSARD, Directeur de Recherches au C.N.R.S., qui a bien voulu accepter d'être mon parrain.

Que M. le P^r KERN, Directeur de l'Institut für Spezielle Botanik à l'Eidgenössische Technische Hochschule de Zürich, trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour les moyens matériels qu'il a gracieusement mis à notre disposition et sans lesquels une partie importante de ces expériences n'aurait pu être réalisée.

A M. le P^r HELLER, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, ainsi qu'à M. KEPES, Directeur de Recherches au C.N.R.S., auquel je suis redevable de nombreux conseils et suggestions sur certains aspects de ce travail, et à M. le P^r SCHAEFFER pour les nombreux conseils qu'il m'a constamment prodigués, j'exprime toute ma gratitude.

Je remercie également M. BELJANSKI, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui m'a permis de faire certaines expériences dans son laboratoire et qui m'a fourni tous les conseils et le matériel désirable.

Enfin toute ma reconnaissance va à tous mes amis du laboratoire, sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à bien, notamment à M^{me} BOUTONNET, et plus particulièrement à M^{lle} VOEGELIN, dont la collaboration technique me fut précieuse.

Les photographies qui illustrent cet ouvrage ont été réalisées par le Service photographique de l'Institut Pasteur.

HISTORIQUE

Un volume de la dimension de cet ouvrage ne suffirait pas à exposer l'ensemble de nos connaissances sur le problème des tumeurs végétales produites par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Aussi l'exposé qui suit ne concernera que les travaux ayant un rapport étroit avec les résultats que nous apportons. Il comprend trois parties : la première consacrée aux notions fondamentales acquises sur la transformation tumorale, la deuxième au rôle que joue la bactérie dans cette transformation, la troisième portant sur les propriétés biochimiques et physiologiques de cette bactérie.

I. — NOTIONS FONDAMENTALES SUR LA TRANSFORMATION TUMORALE

La formation de la tumeur provoquée en présence de la bactérie comporte de nombreuses étapes qui concernent à la fois la bactérie et la cellule végétale. Jusqu'à présent, ces étapes n'ont pu être analysées qu'en partie, et on distingue au cours de la formation de la tumeur trois phases : le conditionnement, l'induction et la prolifération.

A) Le conditionnement

Une blessure doit être faite dans la zone infectée par la bactérie pour obtenir une tumeur. On a d'abord pensé que la bactérie était intracellulaire et que la blessure facilitait sa pénétration dans la cellule. On sait maintenant que les bactéries, marquées par un isotope radioactif, ne peuvent être décelées par autoradiographie qu'à l'extérieur des cellules végétales (STONIER, 1956) [154]. Le rôle joué par la blessure n'a cependant été considéré comme important que graduellement (RIKER, 1923; HILDEBRANDT, 1942; KLEIN, 1955) [138, 74, 93]. Les expériences de BRAUN (1952) [29] mettent plus particulièrement en évidence le rôle spécifique du traumatisme. En inoculant les bactéries à

divers moments après la formation de la blessure et en limitant ultérieurement la durée d'action de la bactérie par élévation de la température à 32° C, BRAUN a montré que les cellules végétales ne peuvent subir la transformation tumorale que durant une période limitée. Cet état physiologique particulier des cellules végétales s'établit indépendamment de la présence de la bactérie et porte le nom de conditionnement. La durée du conditionnement est généralement de l'ordre de deux à trois jours pour des blessures faites à la tige de la plupart des plantes employées : elle est notablement plus courte (12 à 24 heures) pour la feuille de haricot (LIPPINCOTT et HEBERLEIN, 1965) [112].

De nombreuses modifications physiologiques consécutives à la formation de la blessure ont été mises en évidence, comme l'afflux de sels minéraux dans la zone de la blessure (MANIGAULT et SALMON, 1956) [125], des modifications dans l'agencement de la paroi des cellules végétales (MANIGAULT *et all.*, 1959) [126], ou des modifications dans la structure des plastes (HOHL, 1960) [76]. La nature du conditionnement est apparemment en relation avec le processus de cicatrisation de la blessure : il disparaît progressivement à partir du moment où les cellules de la blessure commencent à se diviser [29]. Dans un travail très récent, LIPETZ (1965) [111] propose que la transformation tumorale ne puisse se produire que durant certaines parties du cycle de division des cellules de la plaie. Il démontre de plus que la durée de cette étape dépend de la température. LIORET [110] suggère que le conditionnement assure la transformation de certains gènes préalablement altérés par l'action de la bactérie.

B) L'induction

Pour étudier le mode d'action de la bactérie, BRAUN (1943, 1947, 1951) [24, 26, 28] a tué sélectivement celle-ci à 48° C. Lorsque la bactérie est tuée quatre jours après l'inoculation, les tumeurs obtenues sont de taille comparable à celles produites sur des plantes témoins. Par contre, si la bactérie est tuée 34 heures après l'inoculation, on obtient des tumeurs de taille réduite, la réduction de la vitesse de croissance étant apparemment responsable de la limitation de leur taille. La vitesse de croissance de la tumeur est d'autant plus grande que la bactérie a été tuée plus tardivement. Cette étude montre que :

1° La présence de la bactérie n'est nécessaire que pendant une durée limitée après l'inoculation pour provoquer la formation de la tumeur;

2° Avec une même espèce végétale et une même souche bactérienne, on peut obtenir différentes catégories de tumeurs.

Elles se distinguent entre elles par leur vitesse de croissance. Ce résultat est d'autant plus remarquable que BRAUN a réussi à cultiver *in vitro* des souches de ces tissus tumoraux qui conservent alors leurs vitesses de croissance respectives. L'ensemble des processus qui aboutissent à la transformation tumorale de la cellule conditionnée porte le nom d'induction tumorale. On pense que la bactérie *in situ* élabore et transmet à la cellule végétale certaine(s) substance(s) appelée(s) généralement « Principe inducteur de tumeur » (P.I.T.), dont nous envisagerons par la suite les expériences destinées à l'identifier.

C) La prolifération

L'induction tumorale telle qu'on la définit est celle d'une potentialité dont la prolifération ultérieure des cellules induites est l'expression. En effet, le seul résultat observé est la tumeur.

La possibilité de cultiver *in vitro* les tissus tumoraux et sains de la même espèce végétale a permis d'étudier les facteurs qui interviennent dans leur prolifération. Il a été montré ainsi que le tissu tumoral se distingue, en général, du tissu sain par le fait que certains facteurs de croissance, et notamment l'acide indolyl-3-acétique (AIA) ne sont pas requis dans le milieu de culture pour la croissance *in vitro* (GAUTHERET, 1947; BRAUN, 1947; DE ROPP, 1947) [60, 25, 141]. Cette propriété, fondamentale, suffit d'ailleurs à le caractériser et a été mise en évidence pour de nombreuses espèces végétales [62].

Les expériences de BRAUN [31, 32, 33] et de WOOD et BRAUN [172, 38] illustrent de façon particulièrement claire les exigences nutritionnelles différentes des tissus tumoraux comparativement à celles du tissu sain. Nous savons que BRAUN a pu mettre en culture le tissu des différentes tumeurs obtenues après avoir tué sélectivement la bactérie à divers moments après l'inoculation. Ces tumeurs se distinguent entre elles par leur vitesse de croissance (lente, moyenne, rapide) en milieu de base (sels minéraux + saccharose). En culture *in vitro* le tissu normal de la même espèce végétale (*Vinca Rosea*) ne prolifère activement que si l'on ajoute au milieu de base la glutamine, l'asparagine, l'inositol, les acides cytidylique et guanylique, la 6-furfuryl-amino-purine (kinétine) et l'acide naphthalène-acétique (ANA). Le tissu tumoral à vitesse de croissance lente ne nécessite plus la kinétine, et le tissu tumoral à vitesse de croissance moyenne n'exige plus ni la kinétine, ni les acides cytidylique et guanylique pour proliférer aussi activement que le tissu tumoral à vitesse de croissance rapide sur le milieu de base simple. BRAUN en conclut que la transformation tumorale comporte l'activation partielle ou totale de certaines voies de

biosynthèse concernant des facteurs de croissance spécifiquement impliqués dans la division cellulaire.

Plus récemment WOOD et BRAUN [172, 38], suggèrent que les exigences précédemment définies sont liées à la concentration du milieu en certains ions minéraux (KCl , $NaNO_3$, NaH_2PO_4). En effet, en augmentant la teneur de ces ions dans le milieu, il est possible de provoquer une activation de certaines voies de biosynthèse du tissu sain et certaines des substances dont la présence était précédemment indispensable pour la croissance rapide ne sont alors plus requises. De plus, l'absorption des ions par le tissu étudié est sous la dépendance du méso-inositol présent dans le milieu de culture. De leur travail WOOD et BRAUN concluent que la transformation tumorale implique un changement dans la perméabilité de la paroi ou dans le transport des ions.

Après avoir rappelé ces notions fondamentales acquises dans l'étude de la tumorigénèse, nous envisagerons plus particulièrement l'étude des mécanismes par lesquels la bactérie provoque la transformation tumorale.

II. — MECANISMES D'ACTION DE LA BACTERIE DANS LA TRANSFORMATION TUMORALE

En vue d'étudier le rôle de la bactérie, deux méthodes ont été généralement employées :

- 1° L'inhibition spécifique de la transformation tumorale;
- 2° L'isolement d'extraits acellulaires oncogènes.

Pour que l'inhibition de l'induction soit spécifique, il est nécessaire de montrer que l'agent inhibiteur n'a aucune action nocive sur la bactérie, n'agit pas sur le conditionnement, et n'empêche pas la prolifération de la cellule tumorale. On dispose de deux moyens pour inhiber l'induction :

1° Le premier consiste à élever la température à $32^\circ C$ (BRAUN, 1947) [26]. Une étude thermodynamique a été faite et l'énergie d'activation du processus a été évaluée supérieure ou égale à 80 Kcal/mole [27]. La transformation tumorale implique la formation d'une substance thermolabile vraisemblablement de poids moléculaire élevé. Il faut remarquer que rien jusqu'à présent, ne permet d'identifier cette substance au P.I.T. tel que nous l'avons précédemment défini, puisque la plante comme la bactérie sont placées à la température inhibitrice. Le travail récent de LIPETZ (1965) [111] jette cependant un doute sur la spécificité de l'action de la température : il montre que celle-ci

provoque une cicatrisation précoce et que par ailleurs elle influence le conditionnement. Ce dernier résultat est confirmé indépendamment par GRIBNAU (1965) [69].

En exposant seulement la bactérie à des températures plus élevées (40° C), LIPPINCOTT et LIPPINCOTT (1965) [113] ont pu mettre en évidence, au moyen d'une technique semi-quantitative, une diminution temporaire du pouvoir tumorigène de la bactérie. La chaleur d'activation du processus est cependant plus faible (57 Kcal/mole) que celle mesurée par BRAUN, de sorte que l'on peut se demander, comme les auteurs le font remarquer, si la substance thermosensible est bien la même dans les deux cas.

Un autre moyen d'inhiber spécifiquement la transformation tumorale est l'action de la 5 FUDR* (BOPP, 1964) [21, 22] appliquée dans la blessure infectée. Dans un travail récent, BOPP (1965) [23] précise, en faisant agir la 5 FUDR durant 24 à 32 heures pour que son action soit réversible, que la formation des tumeurs est inhibée pour des applications de la 5 FUDR se situant 72 heures après l'inoculation. Par ailleurs le fait que le D-tryptophane, qui constitue un inhibiteur efficace de la croissance bactérienne, ne provoque pas d'inhibition comparable suggère que l'effet de la 5 FUDR ne porte pas sur les bactéries *in situ*. BOPP suggère que les cellules végétales effectuent une certaine synthèse préférentielle d'ADN, au cours de leur transformation tumorale.

2° Nous n'envisagerons pas l'ensemble des nombreux travaux effectués en vue d'obtenir des extraits acellulaires capables de provoquer des proliférations tumorales. Un examen critique de ces questions a donné lieu à une revue récente (MANIGAULT, 1964) [124]. De tels extraits sont capables de provoquer la formation d'hyperplasies spécifiques, sans toutefois pouvoir reproduire complètement l'action de la bactérie quant à la prolifération illimitée des tumeurs produites. On peut conclure que « l'étude de l'action des fractions acellulaires d'extraits de tumeurs ou de bactéries fait apparaître une complexité inattendue dans les phénomènes de l'induction des tumeurs végétales » (MANIGAULT) [124].

* *

Si l'étude de la carcinogénèse des tumeurs végétales repose maintenant sur des connaissances fondamentales bien établies telles que les notions de conditionnement, d'induction et de prolifération, le rôle que joue la bactérie reste assez obscur. On a d'abord pensé que le F.I.T. pouvait être une hormone de

* 5 Fluoro-déoxy-uridine.

croissance élaborée continuellement par la bactérie. Cette hypothèse a été abandonnée puisqu'on sait maintenant que la présence continue de la bactérie n'est pas requise. L'hypothèse que le P.I.T. serait un ADN analogue aux principes transformants bactériens a été suggérée par KLEIN (1958) [94], qui a essayé de produire des tumeurs au moyen d'ADN isolés extraits de bactéries. Ces expériences n'ont pas été confirmées à la suite d'un examen en commun par KLEIN et BRAUN (1960) [97] des principaux travaux de KLEIN.

Plusieurs auteurs ont suggéré que la cellule tumorale héberge un virus oncogène. En particulier DE ROPP (1947) [142] constate qu'en greffant *in vitro* du tissu tumoral « stérile » sur du tissu sain, du tissu tumoral néo-formé prolifère à partir du tissu sain à proximité du greffon. L'étude histologique montre que ce tissu provient bien du porte-greffe et non du greffon; ce tissu peut être cultivé *in vitro* et il prolifère alors de façon rapide et désorganisée, caractéristique du tissu tumoral. Les expériences de DE ROPP ont été confirmées par d'autres auteurs (CAMUS et GAUTHERET, 1948; Mc EWEN, 1952) [40, 50]. Par ailleurs, le fait que CAMUS *et all.* (1951) [41] aient pu mettre en évidence dans le tissu tumoral une protéine non présente dans le tissu sain est également en faveur de l'hypothèse virale proposée par DE ROPP.

Il convient de rapprocher de ces résultats les expériences de BRAUN (1951, 1954, 1959) [28, 30, 34] sur la reconversion de la cellule tumorale en cellule saine. Cet auteur a montré, en effet, que par greffes successives de tissu de tératomes (provenant d'une seule cellule) sur des tiges saines, du tissu non tumoral peut être obtenu à partir du tissu initial. Il en conclut qu'à la suite des divisions cellulaires très rapides qui se produisent au cours de la croissance du greffon, une particule intracellulaire autoreproductible n'est pas reproduite de façon suffisamment rapide et se trouve diluée, puis perdue, par la cellule qui est reconvertie ainsi en cellule saine.

Il faut remarquer que même si la cellule tumorale héberge un virus oncogène, il n'existe pas, à notre connaissance, d'arguments directs montrant que celui-ci est transmis par la bactérie. On peut concevoir différentes modalités d'action de la bactérie, celle-ci se limitant par exemple à provoquer une « activation » d'un virus latent préexistant (GAUTHERET) [61, 62]. De nombreux auteurs ont abordé le problème en étudiant, de façon plus ou moins systématique, la physiologie de la bactérie, en espérant pouvoir mettre en évidence des particularités éventuellement liées au pouvoir tumorigène. Nous envisagerons dans la troisième partie de cet historique les travaux concernant la physiologie de cette bactérie.

III. — BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA BACTERIE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Après avoir rappelé les principaux aspects de l'action de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* sur les cellules de la plante-hôte nous rapporterons ici les travaux concernant la physiologie et la biochimie de ces bactéries. Dans beaucoup de cas, les auteurs s'attachent à préciser le rôle phytopathogène de la bactérie et leurs études portent sur des caractères très divers. Nous avons groupé leurs résultats pour plus de commodité et nous envisagerons successivement le métabolisme des sucres, qui s'est révélé être très particulier dans certains de ses aspects, le métabolisme des lipides assez singulier lui aussi, le métabolisme des bases puriques et pyrimidiques et des acides nucléiques, ainsi que celui du tryptophane. Les caractères physiologiques concernent la production de vitamine dans le milieu de culture, la mise en évidence du caractère lysogène des bactéries d'une souche tumorigène et de la production d'un antibiotique. Nous envisagerons enfin les moyens de sélectionner des souches atténuées.

★ ★

L'utilisation des sucres par la bactérie a été étudiée depuis longtemps car elle constitue une des propriétés permettant d'identifier le genre et l'espèce bactérienne en taxonomie. CONNER *et all.* (1937) [48] indiquent que les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* font fermenter le glucose (avec peu de production d'acide). HUGH et LIEFSON (1953) [79] rapportent qu'elles produisent de l'acide à partir du glucose et du saccharose dans des conditions aérobies et qu'elles sont aérobies strictes. VAN LANEN (1952) [164] *et all.* précisent que les cellules oxydent rapidement le glucose et le succinate. Les résultats de KATZNELSON obtenus au moyen de bactéries entières (1955) [88] et d'extraits acellulaires (1958) [89] montrent que la bactérie est aérobie stricte et que des extraits bactériens sont capables de produire du pyruvate à partir du 6-phospho-gluconate. Plus récemment, VARDANIS et HOCHSTER (1961) [166] ont étudié plus systématiquement l'activité enzymatique concernant le catabolisme du glucose en extraits acellulaires. Ils en concluent que le cycle des pentose-phosphates fonctionne et que la voie d'Entner-Doudouhoff (le gluconate 6-phosphate est transformé en 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate avec production ultérieure de glyceraldehyde-phosphate et de pyruvate) est le chemin essentiel de l'utilisation des hexose-phosphates dans de tels extraits.

Par la suite, l'intérêt des biochimistes s'est porté plus particulièrement sur une propriété singulière des bactéries *Agrobacterium tumefaciens*. Il a été montré, par plusieurs groupes de chercheurs, que ces bactéries produisent à partir de certains glucosides en fortes concentrations (2 %) comme le lactose, le maltose, le saccharose, le lactobionate, etc..., un dérivé cétonique correspondant qui s'accumule dans le milieu et qui est facilement décelable par réduction de la liqueur de Fehling à froid (BERNAERTS et DE LEY, 1958, 1960, 1961, 1963 [12, 13, 14, 15, 16]; FEINGOLD *et all.*, 1961 [53]; FUKUI et HOCHSTER [57], et FUKUI *et all.*, 1963 [58]. L'analyse de ce dérivé [14, 57] montre que le groupe carbonyl est fixé sur le carbone 3 de la partie glucose du sucre. Ce résultat suggère que l'utilisation de ces glycosides par ces bactéries est assez particulière. BERNAERTS et DE LEY [16] montrent en effet que pour 80 souches représentant 33 espèces étudiées aucune production de composé fortement réducteur ne peut être mise en évidence, et que seules les espèces du genre *Agrobacterium* (*tumefaciens*, *radiobacter*) en produisent. Ils proposent ainsi un test d'identification utilisant la mise en évidence de céto-lactose sur gélose nutritive additionnée de lactose 2 %. C'est un procédé qui se révèle très utile en pratique puisque très rapide. La spécificité de cette réaction a été mise en doute par GREBNER *et all.* (1964 [67] qui, au moyen d'une technique très sensible, ont pu mettre en évidence la formation de 3-céto-saccharose à partir du saccharose par un organisme identifié comme appartenant au genre *Micrococcus*. Si ce résultat suggère que des bactéries très éloignées dans la systématique peuvent avoir un métabolisme du saccharose analogue, ils ne diminuent pas la valeur du « test » de BERNAERTS et DE LEY, puisque l'organisme en question n'accumule pas suffisamment de dérivé cétonique dans le milieu pour pouvoir être mis en évidence par réduction de la liqueur de Fehling dans les conditions décrites [67].

Ces dérivés cétoniques présentent par ailleurs l'intérêt de permettre d'obtenir certains sucres rares (BERNARTS *et all.*, 1963) [17].

La mise en évidence de cette propriété présente également un grand intérêt dans l'étude du catabolisme du glucose. En effet, des résultats très récents (FUKUI, 1965) [56] montrent que le glucose peut également être oxydé sur le carbone 3. De plus l'enzyme catalysant cette réaction a été isolée (GREBNER et FEINGOLD, 1965) [68]. Elle est de nature inductible et transforme le D-glucose et certains hexosides en leurs 3-uloses correspondants.

L'utilisation des acides hexuroniques n'apparaît pas particulière. ZAJIC (1959) [174] note une réduction du NAD* en

* NAD : Nicotiamide dinucléotide.

présence d'extraits acellulaires de bactéries et d'acide glucuronique, de gluconolactone, etc... Plus récemment, CHANG et FEINGOLD (1965) [42] ont montré que le D-glucuronate ou le D-galacturonate est converti en α -céto-glutarate et la déshydrogénase (première enzyme de la séquence) a été purifiée.

Une autre voie d'utilisation du glucose a été mise en évidence par MADSEN. En effet, les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* contiennent du glycogène, une phosphorylase et une glycogène-synthétase actives (MADSEN, 1961) [119]; cette propriété n'est pas spécifique du genre *Agrobacterium*. Le métabolisme du glycogène a été étudié par MADSEN [120] qui montre que la phosphorylase est inhibée (compétitivement) par l'UDPG* et suggère que cette inhibition joue un rôle physiologique dans la synthèse du glycogène (MADSEN, 1963) [122].

En 1942 Mc. INTIRE *et al.* [82] signalent qu'un polysaccharide est produit dans le milieu de culture des bactéries *Agrobacterium tumefaciens*. Ce polysaccharide qui représente 15 à 20 % du sucre métabolisé est composé de glucose et a un poids moléculaire de 3.600 (22 unités). Il est différent d'un mucopolysaccharide (« gomme bactérienne ») mis en évidence quelques années auparavant dans le milieu de culture (CONNER *et al.*, 1937) [48] et composé de glucose et d'acides uroniques en faible proportion (5 %). REEVES (1944) [137] suggère que les molécules de glucose sont attachées par un pont oxygène en liaison 1-2. PUTMAN *et al.* (1950) [136] donnent la structure du polysaccharide en confirmant le modèle proposé par REEVES, résultat également confirmé par MADSEN (1962) [121].

Bien que l'étude de l'utilisation du glucose ait fait l'objet de nombreux travaux, aucune corrélation entre les diverses propriétés énumérées ci-dessus et le pouvoir tumorigène n'a été établie jusqu'à présent.

★ ★

En vue d'étudier leur action sur la plante, CHARGAFF et LEVINE (1936, 1937) [43, 107] isolèrent des fractions bactériennes (lipides et polysaccharides) dont ils vérifièrent qu'elles étaient sans action cancérogène. Plus récemment BERNFELD [18] montre que certains lipides divers peuvent néanmoins provoquer certaines hyperplasies non tumorales. La composition des lipides bactériens fut analysée plus systématiquement par la suite. CHARGAFF et LEVINE (1938) [44] et GEIGER et ANDERSON (1939) [63] mirent en évidence la présence de choline, d'acide oléique et d'un autre acide gras non identifié. VELICK et ANDERSON (1944) [170] et

* UDPG : uridine diphosphoglucose.

VELICK (1944) [168, 169] étudièrent ce dernier composé, appelé « acide phytomonique » : il s'agit d'un acide gras saturé et ramifié. HOFMANN et TAUSIG (1955) [77] montrèrent l'analogie des propriétés de cet acide gras avec celles d'un autre acide gras présent dans les lactobacilles (« acide lactobacillique »). Par la suite la présence d'un noyau cyclopentane dans la structure de l'acide lactobacillique fut établie (HOFMANN *et all.*, 1957) [78]. La présence d'un noyau cyclopentane dans un acide gras extrait des bactéries est confirmée par LAW *et all.* (1963) [104] qui en ont étudié la biosynthèse; ils indiquent également que de tels acides gras ont été signalés dans les lipides de nombreuses bactéries appartenant à d'autres genres.

Par ailleurs, KANESHIRO et MARR (1962) [85] confirment la présence de lécithines (14 % des phospholipides) dans les lipides bactériens. Cette propriété apparaît caractéristique du genre *Agrobacterium* (*tumefaciens*, *radiobacter*, *rhizogènes*) : on ne trouve pas de lécithines dans les phospholipides d'autres bactéries (GOLDFINE et ELLIS, 1964) [65]. La biosynthèse de phosphatidylcholine a été précisée par KANESHIRO et LAW (1964) [86] : la phospho-éthanolamine est méthylée par la S-adénosyl-méthionine en présence d'une enzyme qui a été purifiée.

★ ★

Le métabolisme des acides nucléiques et des bases puriques et pyrimidiques a fait l'objet de travaux récents. En 1956, KI YONG LEE *et all.* (1956) [92] donnent la composition en bases de l'ADN bactérien (21,7 % d'adénine, 20,1 % de thymine, 30,2 %

AT

de guanine et 28,0 % de cytosine soit un rapport — = 0,72. Les

GC

résultats de DE LEY (1964) [109], établis au moyen de l'évaluation de la température de fusion de l'ADN seront discutés en deuxième partie (conclusion du chapitre I). La dégradation des nucléotides adényliques et de l'adénosine a été étudiée en extraits acellulaires par VARDANIS et HOCHSTER (1961) [165]. Ces auteurs mettent également en évidence la présence d'une polynucléotide phosphorylase, qui polymérise l'ADP*, le CDP* et l'UDP*, mais non le GDP* ni un mélange des quatre nucléotides di-phosphates, ce qui résulte d'une action inhibitrice du GDP sur la polymérisation des autres di-phosphates [167]. Cette enzyme ne peut par conséquent catalyser la synthèse des ARN « messagers ». Une RNA polymérase transcrivant l'ADN par polymérisation des

* ADP : Adénosine-diphosphate; CDP : Cytidine-diphosphate; UDP : Uridine-diphosphate; GDP : Guanosine-diphosphate.

nucléotides triphosphates a été en effet mise en évidence et purifiée (HOCHSTER et CHANG, 1963) [75]. L'ADN est nécessaire pour l'activité de l'enzyme, la composition en base de l'ARN synthétisé est identique à celle de l'ADN utilisé. L'actinomycine D inhibe la réaction ($3 \cdot 10^{-5}M$) ainsi que l'atabrine ($3 \cdot 10^{-3}M$).

Par ailleurs SUZUKI et HOCHSTER (1964) [159] ont montré que la pseudo-uridine* s'accumule dans le milieu de culture des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* exposées à l'uracile (0,5 g/l). Le rôle physiologique de cette transformation de l'uracile n'est pas connu

★★

Les seuls travaux relatifs au métabolisme des acides aminés et des protéines ne concernent, à notre connaissance, que le métabolisme du tryptophane. Il constitue le précurseur de l'acide indolyl-3-acétique dont on sait qu'il est une hormone végétale très répandue (PILET) [135]. Le fait que les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* produisent de l'AIA à partir du tryptophane ajouté au milieu de culture a été mis en évidence par BROWN et GARDNER [39] et BERTHELOT et AMOUREUX [19]. Ces auteurs pensaient que cette production était responsable de la prolifération des cellules des tumeurs produites par la bactérie. Cette hypothèse a été abandonnée par la suite (WHITE et BRAUN) [171]. La voie de biosynthèse de l'AIA a été étudiée par KAPER et VELDSTRA (1958) [87]. Cette synthèse aurait pour intermédiaire l'acide indolyl-pyruvique, ce qui a été confirmé par SUKANYA et VAIDYANATHAN (1964) [158], qui ont isolé une enzyme transaminant le tryptophane (avec le phénylpyruvate comme accepteur) et par SAHAI SRIVASTA (1964) [146] qui a isolé l'acide indolyl-pyruvique du milieu de culture des bactéries en présence de tryptophane.

★★

La production de vitamines a été mise en évidence par Mc INTIRE *et all.* (1941) [81], mais n'a pas fait l'objet de recherches ultérieures. La bactérie produit dans le milieu de culture des quantités considérables de biotine (3.500 à 6.300 fois celle nécessaire à une bonne croissance de *Clostridium butylicum*) et de riboflavine (60 fois celle optimale pour *Lactobacillus Casei*) et même d'acide pantothénique (optimale pour *L. Casei*). Bien que ces vitamines soient généralement nécessaires à la culture *in vitro* des tissus végétaux (GAUTHERET) [62], le rôle éventuel de cette production n'a jamais été envisagé, à notre connaissance, dans la transformation tumorale.

* 5-ribosyl-uracile.

L'existence de phages lysant les bactéries *Agrobacterium* a été signalée par CHESTER (1933) [45] et KENT (1937) [90]. BEARDSLEY (1955, 1960) [2, 3] a montré que la souche B6 est lysogène. En effet B6 porte un prophage inducible Ω (la fréquence de lyse spontanée est de 10^{-3} par génération). La libération des phages est accompagnée d'une agglutination des bactéries, et il n'y a pas de lyse bactérienne visible. BEARDSLEY a isolé une souche B6 non lysogène qui apparaît aussi tumorigène que celle hébergeant le prophage : on peut donc conclure que le prophage Ω ne joue aucun rôle dans la formation des tumeurs.

La production d'agrobacteriocine I a été mise en évidence par STONIER (1960) [156]. Cet antibiotique est produit seulement par certaines souches (T37, H 100 non étudiées dans ce travail), et la plupart des autres souches d'*Agrobacterium* y sont sensibles. Il est remarquable que l'action inhibitrice de l'antibiotique puisse être levée par addition au milieu (synthétique) de certains acides aminés (alanine, leucine, isoleucine et glycine) ou de certains dipeptides en faibles concentrations (10^{-5} M). Cet antibiotique est dialysable et diffuse rapidement dans la gélose, son mode d'action est inconnu. Aucune relation n'a pu être établie entre cette production d'antibiotique et le pouvoir tumorigène. Le travail de BEARDSLEY *et al.* (1962) [6] montre cependant que la sélection de certains mutants atténués (résistants à la glycine) permet d'obtenir des mutants qui ont également perdu le pouvoir de produire l'antibiotique.

*
* *

Le pouvoir tumorigène paraît être une propriété particulièrement stable de la bactérie. De nombreux moyens ont été en effet essayés sans succès en vue d'en obtenir l'atténuation de façon stable. Seul un mutant atténué spontané A66 a été isolé, sans sélection évidente, de la souche tumorigène A6 (HENDRICKSON *et al.*, 1934) [73]. Par ailleurs, dès 1934 BERGE *et al.* (cité par VAN LANEN *et al.*) [163] montraient que la croissance des bactéries est inhibée par la glycine et que par passages sur des milieux contenant de la glycine, des souches atténuées sont obtenues. Cette observation fut confirmée par LONGLEY *et al.* (1937) [118] et une étude systématique entreprise par VAN LANEN *et al.* (1940) [162], dont les résultats complets furent publiés ultérieurement (VAN LANEN *et al.*, 1952) [163, 164]. Ces auteurs montrent que la glycine, à concentration supérieure à 1 g/l, inhibe la croissance des bactéries tumorigènes, souche A6. Après un grand nombre de repiquages (31) en présence de glycine (en concentration finale 3 g/l), la quasi-totalité des bactéries est atténuée. Cet effet ne se produit cependant qu'à pH neutre ou alcalin. D'autres acides aminés (glycyl-glycine, DL-alanine, DL-sérine, DL- α -amino-

butyrate, DL-thréonine, DL-norvaline, DL-méthionine, DL-valine, DL-norleucine, DL-isoleucine, L-leucine, L-lysine) provoquent un effet analogue sur la croissance et l'atténuation (VAN LANEN *et al.*, 1952) [164]. Divers mélanges d'acides aminés ont été essayés, et seul un effet additif est constaté. Par ailleurs divers dérivés substitués de la glycine ont été employés (N-méthyl-glycine, N-benzoyl-glycine, glycine-ethyl-ester, glycine anhydride, et 2-amino-ethanesulfonate) : ils produisent un effet favorable ou nul sur la croissance, sans modifier le pouvoir tumorigène.

C'est au cours de cette étude que VAN LANEN *et al.* [163] isolent la souche glycine-résistante 5 Gly, atténuée de façon stable. Ils signalent que d'autres souches résistantes à la glycine et initialement atténuées ont retrouvé leur pouvoir tumorigène par la suite (indépendamment de la résistance à la glycine qui peut être conservée). Dans une étude complémentaire, VAN LANEN *et al.* [164] comparent entre elles certaines propriétés des souches atténuées et tumorigènes et étudient l'action de la glycine sur les bactéries tumorigènes (souche A6). Les comparaisons entre souches atténuées (y compris la souche A66 précédemment citée) montrent que l'atténuation est sans rapport avec l'activité peptidasique sur des di- ou tri-peptides ou avec l'activité respiratoire (réduction du bleu de méthylène ou mesure de l'oxygène consommé). Par ailleurs, la glycine paraît sans action notable sur l'activité de ces systèmes enzymatiques étudiés.

La résistance à la glycine de la souche tumorigène B6 a été étudiée plus récemment par BEARDSLEY (1962) [4], qui a montré que la résistance à la glycine se produit par sélection de mutants spontanés (au moyen de test de fluctuation de LURIA et DELBRUCK). Il note également l'apparition en présence de glycine de formes modifiées ressemblant à des formes L, et en milieu liquide, de sphéroplastes. Il signale que les souches atténuées résistantes à la glycine sont simultanément résistantes à la D-méthionine, la D-valine, la DL-norleucine et la DL-sérine (BEARDSLEY, 1962 [5]). La résistance croisée s'observe également avec des clones isolés sur milieu additionné de D-méthionine, D-valine ou DL-norleucine. Enfin la toxicité des isomères D n'est pas levée par l'isomère L de l'acide aminé correspondant et l'effet létal de ces acides aminés est additif. La résistance aux acides aminés étudiés serait déterminée par plusieurs gènes ou des allèles multiples, et BEARDSLEY suggère que le mécanisme d'action de ces acides aminés porte sur la formation de la paroi et des septa. Une telle action a d'ailleurs été suggérée récemment par LANDMAN et HELLE (1964) [102] à propos de l'action des acides aminés de la série D sur *Bacillus subtilis*.

★ ★

Le rappel des principales connaissances acquises sur le rôle de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* dans la transformation tumorale montre que nous ne pouvons aborder le problème que par des moyens indirects. Aussi nous sommes-nous attachés à étudier les propriétés phytopathogènes et les propriétés physiologiques de la bactérie.

Nous avons tout d'abord étudié, de façon quantitative, la relation qui existe entre le nombre de bactéries inoculées et le poids des tumeurs formées. Cette étude nécessite la connaissance préalable des modalités de la division des bactéries dans la plaie, celles-ci se divisant activement. La relation quantitative obtenue a été discutée en fonction de différentes hypothèses sur le mode d'action de la bactérie. Nous avons également étudié la relation obtenue lorsque les bactéries tumorigènes sont des mutants auxotrophes.

Par ailleurs, nous nous sommes attachés à comparer les propriétés phytopathogènes et physiologiques de mutants bactériens, dont le pouvoir tumorigène a été modifié à la suite d'une mutation. Cette comparaison porte sur les souches atténuées A66, 5 Gly et M39. Nous avons analysé certains aspects de la morphologie et de l'histologie des hyperplasies obtenues et nous nous sommes attachés à préciser le caractère tumoral du tissu de ces hyperplasies en provoquant un apport d'auxines au point d'inoculation. BRAUN et LASKARIS [35] ont pu mettre ainsi en évidence la nature tumorale des hyperplasies produites par A66 : la taille limitée de celle-ci résulte de l'élaboration en quantité limitante (par les cellules végétales induites par A66) de certaines phytohormones. Ce travail a été confirmé par THOMAS et RIKER [160]. L'apport exogène continu d'auxine au point d'inoculation permet alors de mettre en évidence la prolifération active des cellules induites par A66, ainsi que son caractère tumoral. Nous avons analysé, par trois techniques différentes, la nature des hyperplasies produites par les bactéries des autres souches atténuées étudiées.

La deuxième partie de ce travail est consacrée tout d'abord à l'étude d'autres propriétés des bactéries atténuées cultivées *in vitro*, en en comparant les résultats à ceux obtenus avec les bactéries de la souche parente. Le fait que M39 ait été isolé comme ne se divisant pas en milieu minimum nous a incité à comparer les exigences nutritionnelles des différentes souches. Nous avons mis les résultats de cette étude en relation avec ceux de la production de 3-céto-diholosides à partir des diholosides correspondants.

Par ailleurs nous avons comparé la production d'AIA à partir du tryptophane. LOCKE *et all.* (1939) [117] ont montré, au moyen d'un dosage biologique, que les souches A6 et A66 produisent des quantités comparables d'AIA. Nous avons repris cette étude au moyen d'un dosage chimique en étendant les résultats aux deux autres souches atténuées. Le troisième caractère de comparaison entre souches atténuées porte sur le degré de résistance à la glycine que présentent ces bactéries puisque nous savons que la sélection de mutants résistants permet d'obtenir des souches atténuées.

En vue de préciser le mode d'action de la glycine dans la sélection de mutants atténués nous avons étudié certaines des propriétés physiologiques des bactéries tumorigènes exposées à la glycine. C'est en étudiant la pénétration du glucose (fourni sous forme radioactive) que nous avons mis en évidence une propriété très particulière des bactéries de la souche B6. Ces bactéries, exposées à la glycine dans des conditions non bactéricides, dégradent de façon apparente une fraction à renouvellement rapide (BEAUD, 1963) [8]. Nous nous sommes attachés à identifier cette fraction et nous avons discuté les résultats obtenus quant à la relation possible avec le pouvoir tumorigène.

TECHNIQUES

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram-négative en forme de bâtonnet, généralement mobile, munie de cils polaires et ne sporulant pas. Depuis la découverte de SMITH et TOWNSEND, plusieurs dizaines de souches bactériennes tumorigènes ont été isolées indépendamment, le plus souvent sur des hôtes d'espèces différentes. On sait que plus de 170 espèces de plantes-hôtes appartenant à des familles qui peuvent être très éloignées dans la systématique produisent des tumeurs après inoculation de la bactérie. Jusqu'à présent cependant aucune tumeur n'a été mise en évidence chez les plantes monocotylédones. Par ailleurs, les bactéries d'une souche déterminée provoquent la formation de tumeurs dont la morphologie peut être très différente selon l'hôte et l'endroit de la plante inoculée.

Le travail que nous présentons porte sur deux souches sauvages tumorigènes A6 et B6 et leurs mutants atténués A66, 5 Gly (isolés de A6) et M39 (isolé de B6). Les souches bactériennes sont conservées à l'état lyophilisé et sont entretenues par repiquages en tubes de gélose nutritive*. Le milieu de culture synthétique se compose d'un milieu minéral [127] (« milieu M.S. ») dont la composition est la suivante :

$\text{Na}_2 \text{H PO}_4$	1,5 g
$(\text{N H}_4)_2 \text{H PO}_4$	1,0 g
$\text{K H}_2 \text{ PO}_4$	2,0 g
K NO_3	0,25 g
$\text{K}_2 \text{ SO}_4$	0,50 g
Mg SO_4	0,25 g
OH_2	1 l

pH ajusté à 7 par KOH N,

et auquel est ajouté du glycérol (10 g/l) ou du glucose (5 g/l).

Les bactéries sont mises en culture en erlenmeyer ou en ballon en milieu agité (80 cycles par minute) à 30° C. La crois-

* « Nutrient Broth » Difco 8 g/l.

sance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique de la suspension au moyen d'un électrocolorimètre « Meunier » (filtre orange), les valeurs étant exprimées en 1/100^e d'unité.

I. — ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES BACTERIENNES MUTANTES

L'isolement de ces souches a été fait à partir des souches « sauvages » A6 et B6 qui sont tumorigènes. L'origine des différentes souches utilisées est représentée dans le tableau 1.

SOUCHE ATTENUEE	SOUCHES PARENTALES tumorigènes	SELECTION
A66 *	A6 *	Mutant spontané [73].
5 Gly *	A6	Mutant résistant à la glycine [164].
M39	S1 (Souche strepto-résistante isolée de B6 *)	Irradiation U.V. Croissance en présence de lait de coco : 10 %. Méthode à la pénicilline pour isoler les mutants ne poussant pas dans le milieu de base [9].

TABLEAU 1

* Nous devons l'obtention de ces souches à la courtoisie de A.C. BRAUN et T. STONIER.

A) Isolement et morphologie des bactéries des souches atténuées

Isolement et morphologie de A66. — L'isolement de A66 a été fait à partir de la souche A6, sans sélection évidente, de sorte que cette souche peut être considérée comme un mutant atténué « spontané » de A6 [73]. Les colonies et les corps bactériens de A66 ne se distinguent pas de ceux de la souche parente.

Isolement et morphologie de 5 Gly. — L'isolement de cette souche a été fait au cours d'études sur l'atténuation du pouvoir tumorigène par repiquages successifs sur des milieux nutritifs contenant de la glycine ($10^{-2}M$ à $3.10^{-2}M$) [164]. La bactérie se

présente sous la forme de bâtonnets courts et les colonies sont semblables à celles de la souche parente.

Isolement et morphologie de M39. — Le mutant M39 a été recherché dans l'hypothèse que le P.I.T. serait analogue à un principe « transformant » constitué par de l'ADN bactérien (KLEIN) [94]. Si tel était le cas, on pourrait alors penser qu'il existe une relation directe entre l'autotrophie apparente acquise par la cellule tumorale et l'autotrophie connue de la bactérie. Aussi des mutants, sélectionnés comme ne se divisant pas en milieu minimum, mais dont la croissance est permise dans le même milieu additionné de lait de coco, ont été recherchés.

De la souche S1 qui est une souche résistante à la streptomycine (200 mg/l) isolée de B6, a été isolé le mutant M39, le caractère « résistance à la streptomycine » étant utilisé comme « marqueur » pour identifier ultérieurement les mutants obtenus [9]. Les bactéries S1 irradiées par les U.V. ont été mises en culture en milieu de base additionné de lait de coco et sélectionnées par la méthode classique utilisant l'action de la pénicilline [49, 105], pour tenter d'isoler des mutants auxotrophes qui requièrent un (ou plusieurs) facteur de croissance présent dans le lait de coco. La plupart des mutants alors obtenus avaient perdu leur pouvoir tumorigène. Il n'a pas été possible, par la suite, de mettre en évidence de différences dans leurs propriétés, de sorte que dans la présente étude, un seul d'entre eux, M39, a été retenu.

Les colonies formées par les bactéries M39, sur gélose nutritive, se distinguent de celles de la souche parente par leur aspect translucide. La morphologie de la bactérie est modifiée; elle se présente sous forme de bâtonnets plus courts que ceux de la souche parente. La souche M39 est conservée à l'état lyophilisé et est entretenue par repiquage sur gélose nutritive additionnée de glycine à 5 g/l, avec ou sans streptomycine (200 mg/l).

B) Critères d'identification des souches

IDENTIFICATION DE M39

Comme on le verra par la suite, la souche M39 diffère à bien des égards de la souche parente. Aussi, nous nous sommes spécialement attachés à définir au mieux les caractères suivants qui permettent d'affirmer que M39 est bien un mutant appartenant à l'espèce *Agrobacterium tumefaciens* et non un contaminant isolé en cours de manipulation :

a) *Résistance à la streptomycine* : la souche M39 a été isolée à partir de la souche S1 dont elle a conservé la résistance à la streptomycine (200 mg/l);

b) *Réversion spontanée et sélection de reverses* : après de très nombreux repiquages sur gélose nutritive, le pouvoir tumorigène a brusquement réapparu. L'analyse des colonies isolées obtenues montrait alors l'existence de deux types de colonies dont tous les caractères étudiés étaient ceux de la souche mutante (M39) ou de la souche parente (S1). Il s'agit donc d'un retour vers la forme tumorigène de départ, réversion qui a été évitée par la suite en entretenant la souche mutante sur gélose nutritive additionnée de glycine (5 g/l), les fortes concentrations de cet acide aminé ne permettant pas le développement des reverses.

Par ailleurs, nous avons cherché à sélectionner d'autres reverses. En étalant les bactéries M39 sur le milieu minimum gélosé avec le glucose comme seule source de carbone et d'énergie (10^8 bactéries par boîte) on n'observe aucune prolifération, c'est-à-dire qu'il n'apparaît pas de reverses. En remplaçant le glucose par le glycérol, on constate une croissance confluyente 4 à 5 jours après l'ensemencement, les bactéries de la souche M39 se divisant très lentement sur ce milieu. L'isolement de clones provenant de petites colonies (5 à 6 par boîte), qui se distinguent par une croissance plus rapide sur ce milieu, montre que la réversion est apparemment limitée à l'utilisation du glycérol, toutes les autres propriétés étudiées distinctives de M39 étant conservées. La proportion de ces bactéries ayant partiellement reversé est de l'ordre de $5 \cdot 10^{-10}$.

c) *Spécificité immunologique* : la réaction est étudiée semi-quantitativement par la méthode de dilution du sérum anti-B6 (de lapin) en tubes. Les dilutions limites d'agglutination sont données tableau 2. La réaction croisée observée montre l'étroite

	B6	M39	A6	A66	5 Gly
Sérum anti-B6...	1/12 800	1/6 400	1/400	1/400	1/400
Sérum anti-5 Gly..	1/400	1/400	1/25 600	1/25 600	1/25 600

TABLEAU 2

Dilution limite d'agglutination, selon la méthode de dilution en tubes

parenté des souches M39 et B6. Il y a également réaction croisée, à la même dilution limite que celle de la souche parente, avec un sérum anti-5 Gly.

Les mêmes faits s'observent avec des sérums provenant de lapins différents.

d) *Production de 3 céto-lactose (3 CL) à partir du lactose* : cette réaction dont la spécificité permet l'identification du genre *Agrobacterium* s'observe en particulier avec les souches parentales B6 et Sl. Elle est en défaut pour la souche M39. Cette particularité sera étudiée au chapitre 1 de la deuxième partie.

IDENTIFICATION DES SOUCHES 5 GLY ET A66

a) *Spécificité immunologique* : les souches 5 Gly et A66 présentent une réaction croisée avec un sérum anti-B6 à la même dilution limite que celle de la souche parente A6. Par ailleurs, les souches A6 et A66 présentent une réaction croisée avec un sérum anti-5 Gly (*tableau 2*), les dilutions limites d'agglutination étant les mêmes.

b) *Production de 3 C.L. à partir du lactose* : les souches A66 et 5 Gly, comme la souche parente A6, effectuent la réaction. Par ailleurs, aucune réversion vers la forme tumorigène n'a pu être constatée pour les souches A66 et 5 Gly.

En résumé, l'ensemble des propriétés décrites ci-dessus confirme les filiations des souches employées et exclut la possibilité que certaines d'entre elles puissent provenir de contaminations.

IDENTIFICATION DES SOUCHES B6 MET- ET B6 ILEU-VAL-

Une partie de ce travail comporte également l'étude de deux mutants auxotrophes que nous avons isolés de la souche B6. La méthode d'isolement est celle décrite pour M39, le lait de coco étant remplacé par le bouillon de bœuf (Nutrient Broth « Difco », 8 g/l). Ces mutants ont été identifiés [46] comme auxotrophes : B6 met⁻ requiert la méthionine pour la croissance, B6 ileu-val⁻ requiert à la fois l'isoleucine et la valine. Les mêmes critères d'identification ont été utilisés : réaction croisée avec un sérum de lapin anti-B6, production de 3-céto-lactose, production de tumeurs après inoculation à la plante hôte. La proportion de « reverses » est d'environ 2.10^{-7} pour B6 met⁻ et inférieure à 10^{-8} pour B6 ileu-val⁻.

II. — DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A) Mise en évidence de la production de 3-céto-lactose à partir du lactose

Cette mise en évidence se fait de façon qualitative au moyen du « test » de BERNAERTS et DE LEY [16]. Des boîtes de gélose nutritive au lactose (20 g/l) sont ensemencées en un point. Après

incubation de 48 heures (30° C), la boîte est recouverte de liqueur de Fehling et on observe en deux heures, à température ambiante, un anneau jaune d'oxydure autour des bactéries produisant le 3CL.

Nous avons également suivi la production de 3CL de façon semi-quantitative. Les bactéries sont cultivées en milieu liquide auquel le lactose (20 g/l) est ajouté et en quadruplant la quantité des phosphates utilisés dans le milieu M.S. pour éviter des variations du pH [57]. A divers moments, 3 ml de surnageant de centrifugation sont ajoutés à 2 ml de liqueur de Fehling. On note le temps nécessaire pour l'apparition (à température ambiante) de l'oxydure [13].

B) Dosage de l'acide indolyl-3-acétique (AIA) présent dans le milieu de culture

Les cultures sontensemencées en milieu M.S. additionné de glycérol 10 g/l et de tryptophane 1 g/l (stérilisé par filtration sur « Millipore HA » d'une solution à 5 g/l). L'A.I.A. formé à partir du L-tryptophane (Hoffmann-La Roche) est dosé selon la technique de PILET [135]. Le réactif est préparé en dissolvant 6 g de chlorure ferrique dans 250 ml d'eau. On ajoute lentement 300 ml d'acide sulfurique concentré, on laisse refroidir et on complète par 250 ml d'eau. Le réactif est conservé dans un flacon de verre brun. Pour le dosage, à 8 ml de réactif, on ajoute 1 ml d'alcool éthylique, puis 1 ml du liquide dont on dose l'A.I.A. Vingt minutes après, on lit la densité optique. (Electrocolorimètre de MEUNIER, filtre vert, trajet optique 1 cm.) La courbe d'étalonnage est tracée à partir de solutions aqueuses d'A.I.A. (Prolabo) en présence de tryptophane car le dosage de l'A.I.A. produit à partir du tryptophane présent dans le milieu de culture est effectué en présence de l'acide aminé, dont la concentration varie peu. Le dosage s'effectue sur 1 ml de surnageant provenant de la centrifugation de 3 ml. La méthode employée est assez sensible, le dosage étant fait à $\pm 0,7$ mg/l près.

III. — MARQUAGE PAR LES SUBSTANCES RADIOACTIVES

Tous les produits radioactifs proviennent du C.E.A. (Saclay) :

- glucose ^{14}C marqué uniformément (45 mC/mM) ;
- ^{35}S sous forme $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ sans entraîneur ;
- ^{32}P sous forme $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$ sans entraîneur ;
- uracile ^{14}C marqué sur le carbone 2 (10 mC/mM) ;
- tryptophane DL- ^{14}C marqué sur le carbone 2 du noyau indole (5 mC/mM) ;
- adénine ^{14}C marquée sur le carbone 8 (1 mC/mM).

Tous les produits non radioactifs proviennent de Hoffman-

La Roche (France), sauf quelques échantillons de glycine, de provenances diverses.

a) *Mesures par filtration.* — La mesure est effectuée sur filtres Millipores HA (pores de $450\text{ m}\mu$) 2 à 3 ml de milieu minéral à 0°C sont déposés sur le filtre avant de rajouter exactement 1 ml de suspension bactérienne. Le tout est filtré sous vide, le filtre est lavé par trois fois 5 ml de milieu minéral à 0°C et collé sur une coupelle en aluminium pour mesurer la radioactivité au moyen d'un compteur (Nuclear Chicago, « gaz flow » fenêtre « micromil »).

b) *Mesures de la radioactivité présente sous forme insoluble à froid dans l'acide trichloracétique (T.C.A.) à 5 % :* on ajoute à 1 ml de suspension bactérienne 1 ml de T.C.A. à 10 %. Ce mélange est mis à 0°C et 10 minutes après, filtré sur millipore et rincé trois fois par 5 ml d'eau distillée acidifiée par un peu de T.C.A.

c) *Mesure de la radioactivité présente sous forme acido-insoluble à chaud dans le T.C.A. :* à 1 ml de suspension bactérienne refroidie à 0°C on ajoute 1 ml de T.C.A. à 10 %. Dix minutes après, on centrifuge et le culot est lavé à 0°C par du T.C.A. à 5 %. Le culot est remis dans 1,5 ml d'une solution d'ovalbumine à 1 g/l, celle-ci étant utilisée comme entraîneur. On ajoute 1,5 ml de T.C.A. à 10 % et on homogénise bien le précipité. Trois échantillons de 0,1 ml sont prélevés, séchés et leur radioactivité mesurée. On met ensuite les tubes au bain-marie bouillant pendant 30 minutes et on ajoute du T.C.A. à 5 % pour ramener au volume initial. Après refroidissement à 0°C , on centrifuge et on lave le précipité par du T.C.A. à 5 %. Le culot de centrifugation est ensuite repris dans l'ammoniaque normal et la mesure de sa radioactivité permet d'estimer la fraction insoluble à chaud dans le T.C.A.

Les expériences étaient faites avec des suspensions bactériennes de $2 \text{ à } 8 \cdot 10^8\text{b/ml}$. La normalisation des résultats a été effectuée en exprimant les résultats pour $1\text{ }\mu\text{g}$ (10^{-6}g) de poids sec des bactéries.

IV. — EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Les bactéries B6 cultivées en milieu MS glucosé sont marquées 4 minutes par l'uracile ^{14}C ($0,66\text{ }\mu\text{g/ml}$), l'arrêt de l'incorporation s'effectuant en versant la culture sur de la glace pilée. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 0°C puis sont broyées

par l'alumine en poudre dans une solution de tampon Tris* M/100, pH 7,4, MgCl_2 10^{-2}M , de bentonite 1 % et laurylsulfate de sodium 1 %. Les acides nucléiques sont ensuite extraits par la méthode au phénol [54, 64, 71]. L'A.D.N. est détruit par la déoxyribonucléase (250 μg d'enzyme pour 1 mg d'ADN, 5 minutes à température ambiante en présence de Mg^{++}). Les ARN sont séparés par centrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 %) à 25.000 t/m durant 16 heures, au moyen d'une centrifugeuse « Spinco » (Rotor SW25). Le tube est ensuite percé et les gouttes sont recueillies dans 30 à 40 tubes à raison de 8 gouttes par tube. On lit la densité optique de chaque tube à 260 $\text{m}\mu$. On précipite (à 0° C) les ARN par l'acide perchlorique 0,3M (avec la sérum albumine comme entraîneur), les précipités sont lavés par l'acide perchlorique 0,3M puis dissous dans l'ammoniaque N et déposés sur des coupelles. Après séchage, les radioactivités sont mesurées comme précédemment.

V. — EVALUATION DES DIVISIONS BACTERIENNES DANS LA PLAIE D'INOCULATION

Nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer les divisions des bactéries après inoculation dans la plaie (la température de la serre étant comprise entre 24 et 26° C) :

1° En procédant à l'inoculation quantitative des bactéries selon la technique décrite ultérieurement, puis en broyant les fragments de plantes inoculées et en estimant le nombre de bactéries viables par blessure (après numération par étalement sur boîtes de gélose nutritive de suspensions convenablement diluées). Cette méthode ne convient que si le nombre de divisions bactériennes est assez grand (supérieur à 3) ;

2° Une autre méthode plus précise consiste à marquer uniformément les bactéries au ^{35}S dont on sait qu'il n'est pratiquement pas relâché *in vitro* au cours d'une croissance ultérieure [155], puis à évaluer la radioactivité spécifique des bactéries. Cette méthode ne nécessite pas d'inoculation ou d'extraction quantitative, mais n'est utilisable que pour des inoculums suffisamment élevés (10⁴ bactéries par blessure au moins) : elle permet ainsi de compléter les résultats obtenus par la première méthode.

Les bactéries sont préalablement cultivées en milieu M.S. limité en soufre (25 mg/l) et sont inoculées dans le même milieu auquel le sulfate radioactif est ajouté (75 $\mu\text{C}/\text{ml}$) à l'activité spécifique finale 3 mC/mg. La croissance des bactéries marquées

* Tris (hydroxylmethyl) amino méthane.

24 heures à 30° C est identique à celle des bactéries poussant sur le même milieu non radioactif. Les bactéries sont ensuite lavées quatre fois au milieu M.S. (non limité en sulfate) et la radioactivité spécifique par bactérie viable est évaluée. Les bactéries sont ensuite inoculées (120 blessures). La radioactivité spécifique par bactérie viable est alors évaluée selon le protocole suivant :

30 fragments prélevés en cubes de 2 à 3 mm de côté.

Les fragments sont lavés 10 minutes par agitation dans 5 ml de milieu M.S.

Opération précédente répétée jusqu'à ce que la radioactivité des eaux de lavage reste constante (2 - 3 lavages).

Fragments broyés au Potter dans 3 ml de milieu M.S.

5 échantillons de 0,1 ml séchés sur planchette

Dilutions de 10 en 10 puis étalement sur boîtes de gélose nutritive

Evaluation de la radioactivité

On déduit de ces résultats la radioactivité spécifique par bactérie viable. Il a été vérifié que l'auto-absorption du broyat est négligeable dans les conditions décrites. On peut calculer le nombre de divisions bactériennes de ces résultats en faisant l'hypothèse que les blessures lavées ne contiennent plus que des bactéries viables. On évalue donc le nombre minimum de divisions bactériennes.

VI. — INOCULATIONS DES PLANTES PAR LES BACTERIES

La morphologie et l'histologie des hyperplasies provoquées par l'inoculation des différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été étudiées sur deux végétaux : la tige de *Datura stramonium* (L) et l'explantat primaire de topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). Ces matériels offrent deux tissus très différents dans leur morphologie, comme dans leur physiologie. La tige de datura se compose, en effet, de cellules différenciées (épiderme, phloème, cambium, etc...). Le tissu de tubercule de topinambour offre un matériel plus homogène puisque composé d'une majorité de cellules parenchymateuses (avec quelques vaisseaux lignifiés); à l'automne il s'agit d'un tissu au repos.

1° Technique d'inoculation de la tige de datura

Les blessures sont faites par piqûres de la tige à des hauteurs variables, puis sont infectées par dépôt d'une goutte de suspension bactérienne dense ou de bactéries prélevées en milieu solide. Les

plantes sont conservées en serre. Un éclairage d'appoint est fourni par une série de tubes fluorescents assurant 5.000 lux au niveau des feuilles. L'humidité est maintenue supérieure à 60 % au moyen d'un vaporisateur d'eau « Defensor » commandé par un hygrostat. La température de la serre n'est pas maintenue rigoureusement constante, mais un chauffage d'appoint permet de la régler en hiver entre 24° et 26° C.

Les réactions produites sont photographiées 3 à 4 semaines après l'infection. Les fragments sont ensuite fixés au Nava-shine [47] durant 24 heures, rincés la nuit à l'eau courante, inclus dans la paraffine puis coupés en rubans de 20 μ d'épaisseur. La coloration est faite au bleu de toluidine [47]. L'inclusion dans le polyéthylène-glycol a été également employée et permet en supprimant les passages dans l'alcool et le toluène [7, 55] de mieux conserver l'intégrité des structures que l'inclusion dans la paraffine.

2° Technique d'inoculation du tubercule de topinambour

Les explantats primaires du tubercule (var. Blanc commun) préalablement épluché et stérilisé à l'extérieur (par la chloramine à 10 g/l durant 30 minutes) sont prélevés sous forme de petits parallélépipèdes. Ils sont ensemencés en milieu solide de Heller [72] [macro et oligo-éléments auxquels sont ajoutés le glucose (30 g/l) et la gélose (10 g/l), le milieu est stérilisé par autoclavage 110° C - 20 minutes].

Les fragments, utilisés deux à trois jours après leur mise en culture, sont blessés sur leur face supérieure bien sèche au moyen d'une pipette Pasteur. La blessure est immédiatement infectée par inoculation d'une goutte de suspension dense de bactéries en évitant la formation de bulles d'air, ou par dépôt des bactéries prélevées en milieu solide. Les tubes sont ensuite placés à 22° C à la lumière diffuse et les réactions observées deux à trois semaines plus tard. L'analyse histologique est faite selon la technique déjà décrite.

★ ★

Nous avons également étudié le pouvoir tumorigène des bactéries des différentes souches après avoir provoqué un apport de phytohormones au point d'inoculation par deux techniques différentes.

3° Technique d'inoculation des cals de tiges décapitées de tomate

Les bactéries de la souche atténuée étudiée sont inoculées

par une blessure transversale de la tige au niveau du 3^e ou 4^e entrenœud. Deux jours après, la tige est sectionnée 2 à 3 mm au-dessus du point d'inoculation. La section est recouverte de pâte de lanoline contenant 2 % d'A.I.A. (préparée en dissolvant 200 mg d'A.I.A. dans le volume d'alcool minimum puis en mélangeant intimement à 40° C avec 10 g de lanoline pure). L'application est répétée deux fois à sept jours d'intervalle [35]. L'auxine *exogene* diffuse dans la plante et provoque la formation d'un cal au niveau de la blessure infectée. Les tumeurs sont observées quatre à six semaines après l'inoculation.

4^e Technique d'inoculation des cals de segments de tiges de *datura* cultivés « in vitro » en sens inverse

Des plantes de trois semaines de *Datura stramonium* sont sacrifiées, les feuilles et les bourgeons excisés. Les tiges sont stérilisées à la surface par la chloramine (10 g/l - 10 minutes) puis rincées plusieurs fois à l'eau stérile à 8 g/l de ClNa et coupées en segments de 3 cm de long, puis placées verticalement en tubes contenant du milieu de Heller avec ou sans auxine (ANA*, 1 mg/l). L'extrémité apicale étant enfoncée dans le milieu, le segment de tige est alors en « sens inversé ». 24 à 48 heures après, une goutte d'une suspension bactérienne est déposée sur la section supérieure du segment. Les tubes sont placés à la lumière diffuse puis les réactions sont observées un mois plus tard [143].

Au moyen de cette technique, l'auxine *endogene* est concentrée au niveau de la section radiculaire des segments de tige à la suite d'un phénomène de transport polarisé (de l'extrémité apicale vers l'extrémité radiculaire). Les cals auxiniques ainsi formés présentent une morphologie très différente selon le végétal employé [62]. Dans le cas de la tige de *datura*, ils restent de taille limitée et se distinguent aisément d'une tumeur.

5^e Techniques d'inoculation quantitative et de mesure

a) TECHNIQUES D'INOCULATION

Les modifications que nous avons introduites à celles précédemment décrites portent sur deux points :

1^o Les blessures doivent être faites de façon aussi régulière que possible (nous employons un trocart constitué par une aiguille en acier munie d'un arrêt et dont la pointe est arrondie). Trois blessures sont faites par plante. Les bactéries sont inoculées,

* ANA : acide naphthalène acétique.

à volume constant (1 μ l), au moyen d'une seringue à insuline dont le piston est commandé par un palmer. La goutte est formée à l'extrémité de l'aiguille puis déposée dans la blessure, où elle est absorbée. L'inoculation d'un nombre variable de bactéries se fait par dilution de la suspension d'origine;

2° L'analyse de la transformation tumorale est rendue quantitative par l'évaluation du poids des tumeurs excisées au scalpel. Cette excision comporte, pour les tumeurs les plus petites, une part d'interprétation, la partie intrusive de la tumeur n'étant plus nécessairement négligeable par rapport à la partie extrusive. En pratique, ceci limite l'analyse au domaine 10 % - 100 % du poids maximum. Il est néanmoins possible que le domaine 5 % - 10 % soit encore valable.

Les trois tumeurs d'une plante ont été généralement pesées ensemble (au mg près). Certaines expériences ont comporté la pesée de chaque tumeur, ce qui permet d'évaluer la variance du poids des tumeurs d'une même plante et de la comparer à celle des poids moyens de chaque plante. Le choix de trois tumeurs par plante résulte du fait que pour un nombre supérieur de tumeurs la variation « plante à plante » devient plus grande que celle de l'ensemble des tumeurs d'une même plante. On n'augmente donc plus beaucoup la précision en provoquant davantage de tumeurs par plante. Par ailleurs, en ne prenant que trois tumeurs par plante, on exclut le risque que la vitesse de croissance des tumeurs soit limitée par l'épuisement des facteurs nutritifs de la plante.

Pour atteindre une précision suffisante dans les résultats, il est nécessaire d'utiliser un grand nombre de plantes. On peut alors déceler des variations *systématiques* dans le poids des tumeurs dues vraisemblablement à la place des lots de plantes dans la serre. Ces variations systématiques étant apparemment les mêmes quelle que soit la taille des tumeurs, il est possible de les éliminer en évaluant pour chaque lot le poids des tumeurs produites après inoculation d'une suspension dense de bactéries tumorigènes. Ces plantes (« témoins ») sont placées dans le même lot que les plantes utilisées pour l'expérience et prises en nombre égal en alternant pot à pot les plantes de l'expérience et les plantes témoins. Il ne nous était pas possible de déplacer ultérieurement les plantes.

D'autres expériences comportent un nombre plus faible de plantes (50 à 60) et le facteur « position des plantes » dans la serre peut alors être négligé.

b) ANALYSES STATISTIQUES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Pour vérifier l'homogénéité du matériel ou pour déterminer

la précision des résultats, une analyse statistique est nécessaire. Cette analyse repose sur l'étude de la moyenne et de la variance. Pour pouvoir interpréter ces estimations, il est souvent nécessaire de faire une hypothèse sur la nature de la loi de probabilité qui correspond aux mesures faites. Cette loi sera supposée être du type de LAPLACE-GAUSS, et nous utiliserons les tables relatives à la loi de Student (« test t ») ou de BEHRENS-FISHER-SNEDECOR (« test F ») [115]. Le test $\hat{t}$ de la différence de deux moyennes n'est applicable que si les estimations des variances ne sont pas différentes. Lorsque nous avons rencontré cette éventualité (deux groupes de variances différents), nous avons eu recours à la méthode de SNEDECOR [150] : on effectue le test t selon la méthode habituelle, mais on lit la valeur de t correspondant aux degrés de liberté du groupe d'expériences le moins précis. D'une façon générale, la comparaison de deux moyennes se fait au moyen du « test t »; celle des deux variances au moyen du « test F » [115]. Une différence est considérée comme significative au seuil de 5 %.

PREMIERE PARTIE

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les propriétés phytopathogènes des bactéries de différentes souches d'Agrobacterium tumefaciens. Nous avons tout d'abord étudié la division de bactéries atténuées et tumorigènes in situ ainsi que celle de deux mutants auxotrophes. Nous nous sommes attaché ensuite à établir la relation qui existe entre le poids des tumeurs et le nombre de bactéries tumorigènes inoculées. Enfin, une étude comparée des propriétés phytopathogènes de différents mutants atténués est décrite dans le dernier chapitre.

CHAPITRE I

DIVISIONS DES BACTERIES DANS LA PLAIE D'INOCULATION

Nous avons étudié la division des bactéries dans la plaie d'inoculation en ayant pour but :

1° De définir, de façon au moins approximative, la grandeur de la population bactérienne en fonction du temps. Ces résultats nous seront, en effet, nécessaires par la suite pour l'étude de la relation qui existe entre le poids des tumeurs et le nombre de bactéries tumorigènes inoculées;

2° De préciser si les bactéries M39 ne sont pas carencées après inoculation à la plante. Ces bactéries présentent de nombreuses déficiences nutritionnelles et on peut se demander si l'atténuation de la souche n'est pas une conséquence de leur carence *in situ*. Par ailleurs, nous avons également étudié la carence éventuelle des mutants auxotrophes B6 met⁻ et B6 ileu⁻ val⁻, dont le pouvoir tumorigène sera étudié au chapitre suivant.

Les divisions bactériennes ont été évaluées au moyen de deux techniques. La première (inoculation et extraction quantitative) permet de mettre en évidence des divisions nombreuses (plus de 3 divisions entre la première et la dernière observation), la seconde (évaluation de la radioactivité spécifique) est plus adaptée au cas où les divisions bactériennes sont peu nombreuses (de 1 à 3) et où l'inoculum est relativement fort (supérieur à 10⁴ bactéries par blessure). Sauf indication contraire, les expériences sont faites à 25° C.

INOCULATIONS ET EXTRACTIONS QUANTITATIVES

a) Souches B6 et mutants auxotrophes B6 met⁻ et B6 ileu⁻ val⁻

Les résultats obtenus avec les trois souches B6, B6 met⁻ et B6 ileu⁻ val⁻ sont représentés fig. 1. Les bactéries B6 se divisent activement de façon sensiblement exponentielle, la popu-

lation doublant en 10 à 12 heures à 25° C jusqu'à ce qu'elle atteigne approximativement $5 \cdot 10^5$ bactéries par blessure, puis restant ensuite constante dans les jours qui suivent. Les résultats obtenus

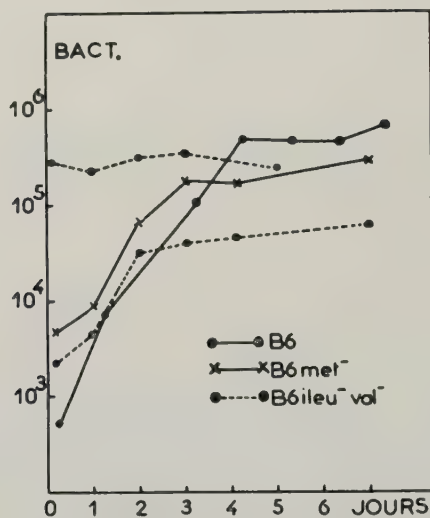


FIG. 1. — Nombre de bactéries extraites de la blessure en fonction du temps après leur inoculation (B6, B6 met⁻, B6 ileu⁻ val⁻) à *Datura stramonium* L.

avec B6 met⁻ sont analogues à ceux obtenus avec B6. Par contre, ceux obtenus avec B6 ileu⁻ val⁻ montrent que la population finale, en fin de croissance, est dix fois moins grande que celle obtenue avec la souche parente B6 inoculée dans les mêmes conditions. Remarquons que les bactéries carencées B6 ileu⁻ val⁻ ne se lysent pas *in situ*. La proportion de reverses dans la population est de $2 \cdot 10^{-7}$ pour B6 met⁻ et inférieure à 10^{-8} pour ileu⁻ val⁻ et il n'y a pas de sélection de reverses dans la plaie d'inoculation puisque aucun reverse ne peut être trouvé sur 10^5 bactéries extraites de la blessure.

TEMPS	M39	5 Gly	A66
4 h.	$7 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
96 h.	$4 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^5$

TABEAU 3

Nombre de bactéries viables extraites de la blessure 4 heures et 96 heures après leur inoculation à *Datura stramonium* L.

Nombre de bactéries extraites par blessure. La température de la serre était exceptionnellement basse : 20 à 22° C.

b) Souches atténuées M39, 5 Gly et A66

Les résultats obtenus avec ces trois souches montrent que les bactéries atténuées se divisent dans la plaie d'inoculation (tableau 3). En particulier, les bactéries M39 se divisent aussi activement que les bactéries 5 Gly et A66, ce qui suggère que les bactéries M39 ne sont pas carencées *in situ*.

EVALUATION DES DIVISIONS BACTERIENNES PAR L'ESTIMATION DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE

Nous avons également étudié la division des bactéries M39 et B6 dans le cas des inoculums supérieurs à 10^4 bactéries par blessure. Les bactéries B6 et M39 marquées par le ^{35}S sont inoculées puis leur radioactivité spécifique est évaluée à divers intervalles de temps. Compte tenu du nombre des bactéries inoculées et des résultats précédents, nous devons nous attendre à un nombre relativement peu élevé de divisions. L'expérience confirme ces prévisions (fig. 2) et montre que le nombre de

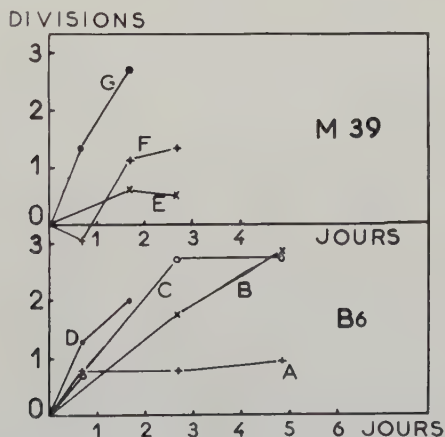


FIG. 2. — Nombre de divisions bactériennes en fonction du temps
(plante-hôte : *Datura stramonium* L.)

Inoculum B6 : A : 6.10^5 , B : 2.10^5 , C : 2.10^5 , D : 10^4 bactéries par blessure.
Inoculum M39 : E : 3.10^5 , F : 10^4 , G : 3.10^4 bactéries par blessure.

divisions mesurées deux à trois jours après l'inoculation varie en sens inverse de celui de la taille de l'inoculum : quand l'inoculum dépasse 3.10^5 bactéries, les bactéries ne se divisent pas plus d'une fois.

Le comportement de M39 est analogue à celui de B6, ce qui confirme les résultats précédents.

DISCUSSION

Les résultats présentés montrent que lorsque l'inoculum est suffisamment faible, les bactéries tumorigènes se divisent activement dans la plaie d'inoculation. Le nombre des bactéries augmente de façon sensiblement exponentielle (temps de doublement de 10 à 12 heures à 24-26° C) en fonction du temps puis atteint la valeur constante d'environ 5.10^3 bactéries (par blessure), sans qu'il y ait de lyse bactérienne ultérieure. Ces résultats sont en accord avec ceux signalés par BRAUN [26] et indiquent qu'un facteur limitant pour la croissance bactérienne apparaît dès que la population atteint environ 3.10^3 bactéries par blessure, sans que l'on puisse en préciser la nature.

Par ailleurs, les bactéries des souches atténuées 5 Gly, A66 et M39 se divisent apparemment de la même façon dans la plaie. Ce résultat est en accord avec le fait que les bactéries A66 et 5 Gly ne présentent pas de déficiences nutritionnelles. Les bactéries M39, qui en présentent, ne sont cependant pas carencées dans la plaie d'inoculation où elles trouvent des substances utilisables comme source de carbone et d'énergie.

Le mutant auxotrophe B6 met⁻ ne présente pas de carence lorsqu'il est inoculé dans la plaie alors que le mutant B6 ileu⁻ val⁻ présente une carence qui n'est d'ailleurs pas absolue. Ces propriétés nous ont incité à comparer ultérieurement le pouvoir tumorigène de ces deux mutants afin d'étudier l'influence éventuelle de la carence en acides aminés sur le pouvoir tumorigène des bactéries *in situ*.

Par ailleurs, on peut rapprocher les résultats décrits concernant la cinétique des divisions bactériennes de la durée de l'état de conditionnement, qui s'établit pour le matériel utilisé (tige de datura) du 1^{er} au 3^e jour pour disparaître dès le 4^e jour après la formation de la blessure. Ce dernier résultat a été établi selon la méthode de BRAUN [29] : on inocule les bactéries à divers moments après la formation de la blessure et on limite à 24 heures la durée d'action de la bactérie en élevant ultérieurement la température à 32° C.

Lorsque l'inoculum est de l'ordre de 4.10^3 bactéries, celles-ci se divisent activement du 1^{er} au 3^e jour, durée qui coïncide avec celle de la période du conditionnement. Comme nous le verrons au chapitre suivant, un tel inoculum est suffisant pour obtenir une tumeur de sorte que l'élaboration du P.I.T. s'accompagne de la division active des bactéries. Cette remarque n'exclut pas cependant que seule une proportion non décelable des bactéries *in situ* se lyse en élaborant le P.I.T. En étudiant la relation quantitative entre le poids des tumeurs et le nombre de bactéries inoculées, on pouvait espérer préciser le mode d'action de la bactérie, et en particulier la proportion de bactéries efficaces pour la transformation tumorale.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA RELATION ENTRE POIDS DES TUMEURS ET NOMBRE DE BACTERIES INOCULEES

Hypothèses sur l'efficacité de la bactérie

La cinétique de la formation des tumeurs en fonction du nombre de bactéries infectantes n'est pas connue. En effet, les auteurs qui ont abordé ce problème, bien avant que la notion de conditionnement et d'induction tumorale ait été clairement définie, ont conclu que la taille des tumeurs est sensiblement indépendante du nombre de bactéries inoculées (LEVINE en 1922 et HILDEBRANDT en 1942) [106, 74]. Des résultats préliminaires (BEAUD et MANIGAULT, 1964) [10] nous ont montré, au contraire, que la taille des tumeurs est dans un certain domaine une fonction croissante du nombre de bactéries inoculées. Nous avons cherché à interpréter nos résultats en fonction de diverses hypothèses sur le mode d'action de la bactérie.

1° RELATION EXPERIMENTALE OBTENUE

A) Inoculation par les bactéries B6

Nous nous sommes attaché à montrer l'effet de la dilution de l'inoculum sur le poids des tumeurs obtenues un mois après son inoculation à la tige de *Datura stramonium* L. Le poids d'une tumeur dépend à la fois du nombre de cellules végétales induites et de leur vitesse de croissance. Nous avons cherché à définir si la taille (réduite) des tumeurs obtenues à la suite de l'inoculation d'un faible nombre de bactéries s'explique par une réduction du nombre de cellules induites ou par une réduction de la vitesse de croissance des tumeurs.

★★

Chaque expérience porte sur quarante plantes. Toutes les plantes sont blessées et vingt plantes (série témoin) sont inoculées

par une suspension de B6 non diluée, les vingt autres (série expérimentale) par une dilution D de la même suspension (D : 1/10, 1/30, etc...).

L'ensemble des mesures faites est représenté tableau 4. Nous ferons deux remarques à propos de ces résultats :

DILUTION	n	ΣP	σ^2	i	M	R %
1:10	18	1413	744	14	78,5	62,0
TEM. 1:10	20	2525	2323	23	126,2	
1:30	16	357	110	6	22,3	15,7
TEM. 1:30	13	1848	7533	53	142,2	
1:60	17	640	250	8	37,6	25,2
TEM. 1:60	13	1940	6711	16	149,2	
1:100	14	523	889	17	37,3	17,2
TEM. 1:100	15	3194	2192	26	212,9	
1:300	14	190	44	4	13,5	8,8
TEM. 1:300	14	2117	1492	23	151,0	
1:600	16	137	35	3	8,5	3,6
TEM. 1:600	15	3569	2970	31	237,9	

TABEAU 4

Poids des tumeurs en fonction de la dilution de l'inoculum

Tem. : Série témoin (suspension non diluée) de la série expérimentale (suspension diluée).

n : Nombre de mesures du poids p_i des trois tumeurs d'une plante (avec $i = 1, 2, \dots, n$).

ΣP : Somme des poids p_i d'une série.

σ^2 : Variance estimée par $\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \left[\Sigma P^2 - \frac{(\Sigma P)^2}{n} \right]$

i : Intervalle de confiance au seuil de 5 % avec $i = t \sigma$, t étant lu dans la table de Student avec $n-1$ degrés de liberté.

M : Poids moyen des trois tumeurs d'une plante avec $M = \frac{\Sigma P}{n}$.

R : Poids relatifs exprimés en % du poids moyen de la série témoin.

Les mesures de poids sont exprimées en cg.

1° La moyenne et la variance des séries témoins (plantes inoculées par B6 non dilué) varient considérablement d'une série à l'autre et significativement plus qu'à l'intérieur d'une même série. Nous retrouvons l'influence de la position de la plante dans la serre sur le poids des tumeurs (Techniques);

2° Cet effet systématique se manifeste dans l'ensemble des 120 plantes inoculées par les différentes suspensions diluées de B6. Elle rend très contestable les choix de la moyenne M du poids des tumeurs comme variable pour étudier l'influence de la dilution de l'inoculum. En faisant le rapport de la moyenne de la

série expérimentale à celle du témoin, il est possible d'éliminer en grande partie la variabilité précédemment mise en évidence. Par contre, il n'est pas facile d'obtenir une estimation de la précision avec laquelle ce rapport est évalué, ce qui nous a conduit à étudier la variable R.

R est défini comme le rapport du poids des trois tumeurs de la plante inoculée par la suspension diluée D au poids des trois tumeurs de la plante témoin, *immédiatement adjacente* dans la serre (et inoculée par la suspension non diluée). Remarquons que le choix de la plante témoin est fixé par la disposition des plantes dans la serre, celle-ci étant déterminée *avant* de faire l'expérience.

L'ensemble des mesures faites est représenté tableau 5 et fig. 3. L'estimation du rapport des poids des tumeurs et la

DILUTION	n	ΣR	σ^2	R_m	i
1:10	18	1245	502	69,2	11,0
1:30	10	165	41	16,4	4,6
1:60	13	275	69	21,2	5,1
1:100	10	169	134	16,9	8,2
1:300	8	62	19	7,8	3,6
1:600	13	60	8	4,6	1,7

TABLEAU 5

Poids des tumeurs en fonction de la dilution de l'inoculum

Pour l'explication des symboles, voir la légende du tableau 4 et le texte

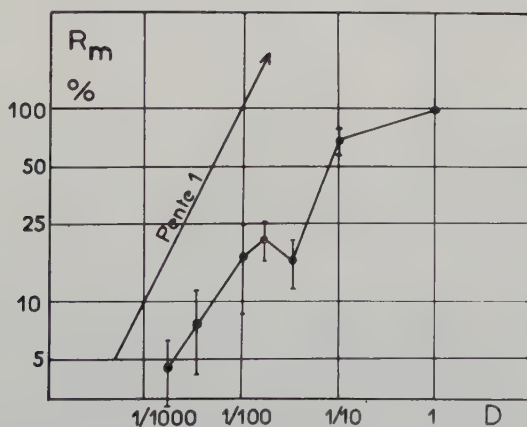


FIG. 3. — Valeur moyenne du rapport R en fonction de la dilution de la suspension de bactéries B6

D : Dilution de l'inoculum. R_m : Valeur relative du poids des tumeurs.
Pente 1 : Représentation, selon les échelles utilisées, de la relation de proportionnalité $R_m = kD$ (k étant une constante arbitraire).

confiance attachée à cette estimation ont pu être calculés. La comparaison entre les tableaux 4 et 5 montre que les estimations des valeurs R obtenues d'une part par le rapport des moyennes, d'autre part par la moyenne des rapports, sont en bon accord. Les évaluations des intervalles de confiance de la moyenne comme le calcul de la pente de la droite de régression calculée sur l'ensemble des résultats ($0,58 \pm 0,28$) montrent que le poids des tumeurs est une fonction croissante du nombre des bactéries inoculées et que la précision des résultats est suffisante pour mettre en évidence un tel effet.

Par ailleurs, nous avons cherché à définir si l'effet de dilution de l'inoculum porte sur la vitesse de croissance ou sur le nombre de cellules végétales induites. Dans l'hypothèse où l'effet de dilution de l'inoculum porte sur la vitesse de croissance de la tumeur, on devrait s'attendre à ce que le rapport R des poids décroisse rapidement en fonction du temps. Il devrait être constant dans l'hypothèse où l'effet de la dilution de l'inoculum porte sur le nombre de cellules induites.

Le tableau 6 donne un exemple de la constance de R, aux erreurs expérimentales près, alors que le poids des tumeurs a presque décuplé.

TABEAU 6

POIDS * MESURÉS APRÈS	B6 NON DILUÉ	B6 DILUÉ 1/100	R
21 jours	1,34	0,42	31 %
40 jours	12,10	3,14	26 %

* Poids total (en grammes) de 20 tumeurs excisées.

Ainsi, lorsque les bactéries sont inoculées en faible nombre, les cellules conditionnées ne sont induites qu'en nombre limitant, et la vitesse de croissance des tumeurs est apparemment la même, quelle que soit leur taille. Ce résultat nous a incité à préciser l'allure de la courbe expérimentale donnant le poids des tumeurs en fonction du nombre de bactéries inoculées.

B) Inoculation par les bactéries B6 met⁻

Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus en utilisant les bactéries B6 met⁻, dont on sait qu'elles ne sont pas carencées *in situ*. L'expérience comporte l'inoculation de suspensions diluées de ces bactéries, avec un grand nombre de dilutions, les plantes témoins étant inoculées avec une suspension dense de la souche parente B6. Les résultats sont donnés au tableau 7 et représentés figure 4. L'examen du tableau 7 suggère les mêmes

SERIE	n	ΣP	σ^2	i	M	R %
B6 met ⁻ N.D.	20	5151	—	—	258	93
B 6 N.D.	20	4764	—	—	238	
B6 met ⁻ 3:4	18	4055	6244	39	225	104
B 6 N.D.	20	3367	3488	28	164	
B6 met ⁻ 1:2	20	4483	—	—	224	104
B 6 N.D.	20	3735	—	—	187	
B6 met ⁻ 1:4	20	3225	—	—	161	81
B 6 N.D.	20	3434	—	—	172	
B6 met ⁻ 1:10	20	3136	—	—	157	90
B 6 N.D.	20	3009	—	—	151	
B6 met ⁻ 3:40	20	3932	8851	43	197	64
B 6 N.D.	20	5304	20 538	67	265	
B6 met ⁻ 1:20	19	3163	6 276	39	166	63
B 6 N.D.	20	4318	5 916	34	216	
B6 met ⁻ 1:40	20	1 671	28 073	79	84	46
B 6 N.D.	20	3 147	2 662	24	154	
B6 met ⁻ 1:100	20	1 037	—	—	52	23
B 6 N.D.	20	3 977	—	—	199	
B6 met ⁻ 1:200	20	938	724	13	47	21
B 6 N.D.	20	3 806	9 008	44	190	
B6 met ⁻ 1:400	20	353	304	8	18	7
B 6 N.D.	19	4 414	9 499	47	232	
B6 met ⁻ 1:800	20	348	—	—	17	5
B 6 N.D.	20	5 998	—	—	300	

TABLEAU 7

Poids des tumeurs en fonction de la dilution de l'inoculum

N.D. : Suspension bactérienne non diluée (témoin).

M : Poids moyen des trois tumeurs d'une plante.

Pour l'explication des symboles, voir la légende du tableau 4.

Les mesures de poids sont exprimées en cg.

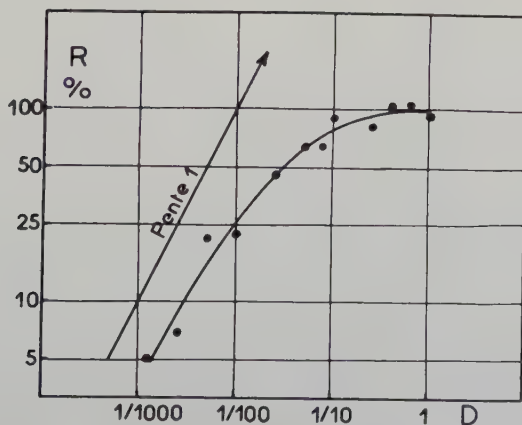


FIG. 4. — Valeur de R en fonction de la dilution de la suspension des bactéries B6 met⁻

R : Rapport des moyennes. Pour les autres symboles : légende de la fig. 3.

remarques que celles faites à propos du tableau 4 : il est à noter que le poids maximum des tumeurs provoquées par B6 met⁻ est voisin de celui obtenu par B6, d'une part, et nous avons vérifié, d'autre part, qu'il est obtenu avec des inoculum du même ordre de grandeur, ce qui implique une efficacité analogue. La courbe de la figure 4 peut être divisée en trois domaines :

a) Une zone de saturation où le poids des tumeurs est indépendant du nombre des bactéries inoculées (dilutions 1 à 1/10) ;

b) Une zone où le poids des tumeurs est une fonction croissante, mais non linéaire (dans l'échelle log-log.), de l'inoculum (dilution de 1/10 à environ 1/200) ;

c) Une zone éventuellement compatible avec la proportionnalité entre poids des tumeurs et taille de l'inoculum (dilutions inférieures au 1/200). Il faut néanmoins remarquer que cette zone se situe à la limite du domaine mesurable.

Ces résultats montrent que B6 met⁻ est capable d'induire des tumeurs de tailles comparables à celles obtenues avec B6, ce qui est en accord avec le fait déjà acquis que les bactéries B6 met⁻ ne sont pas carencées dans la plaie d'inoculation.

Nous avons groupé les résultats obtenus avec B6 et B6 met⁻. Les suspensions d'origine n'étant pas, pour des raisons matérielles, normalisées, il est nécessaire de faire coïncider les courbes par glissement le long de l'échelle des abscisses. Les résultats de trois expériences indépendantes montrent (fig. 6) que les points représentatifs se répartissent autour d'une courbe dont les caractéristiques sont analogues à celles décrites de la figure 4. L'inoculum de la suspension non diluée ($D = 1$) correspond alors

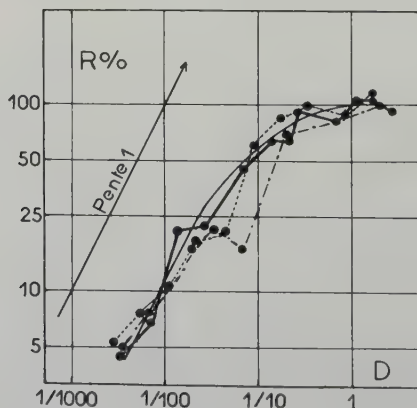


FIG. 5. — Relation entre le poids des tumeurs et la dilution de l'inoculum
Résultats normalisés (voir texte et légende de la fig. 3)

approximativement à 10^5 bactéries par blessure, comme nous le verrons par la suite.

C) Inoculation par les bactéries B6 ileu⁻ val⁻

Le fait que les bactéries B6 ileu⁻ val⁻ soient carencées *in situ* nous a incité à étudier leur pouvoir tumorigène. Dans ces expériences nous avons de plus estimé approximativement le nombre de bactéries inoculées en déterminant le nombre de bactéries de la suspension initiale, le volume de l'inoculum étant connu.

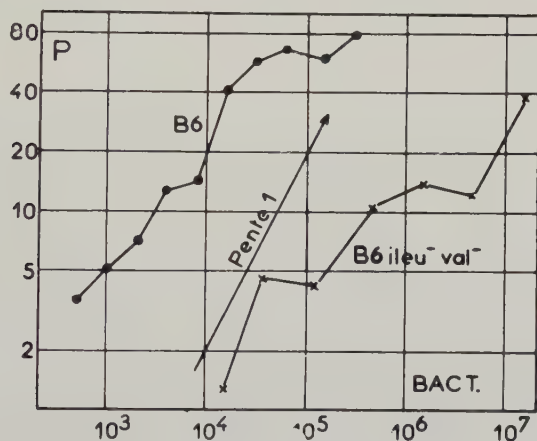


Fig. 6. — Relation entre le poids des tumeurs et le nombre de bactéries inoculées (B6 et B6 ileu⁻ val⁻)

En ordonnées : poids total de 18 tumeurs excisées (en dg). En abscisses : nombre approximatif de bactéries inoculées par blessure

L'examen de la figure 6 montre que les courbes représentatives des résultats obtenus avec les bactéries B6 et B6 ileu⁻ val⁻ présentent un décalage (le long de l'axe des abscisses) équivalent à un facteur 100. L'efficacité des bactéries carencées apparaît donc 100 fois moins grande que celle des bactéries prototrophes. On retrouve l'effet de dilution de l'inoculum pour les bactéries B6 et le poids maximum des tumeurs est alors obtenu pour un inoculum de l'ordre de 10^5 bactéries par blessure. Par ailleurs, la souche B6 ileu⁻ val⁻ provoque la formation d'hyperplasies de tailles significativement plus petites que celles provoquées par la souche parente B6, que les bactéries B6 ileu⁻ val⁻ soient carencées ou non avant l'inoculation. De plus, ces tumeurs sont bien greffables, et en prolongeant la durée de l'expérience, on constate que la vitesse de croissance de ces tumeurs est approximativement la même que celle des tumeurs provoquées par B6. On peut donc conclure que la taille réduite des tumeurs obtenues

avec B6 ileu⁻ val⁻ s'explique, non pas par une atténuation de la souche, mais par le fait que les cellules conditionnées ne sont induites qu'en nombre limité. L'efficacité réduite cependant observée des bactéries B6 ileu⁻ val⁻ ne résulte pas d'une sélection de reverses, mais plus vraisemblablement de l'imperfection de la carence, qui permet quelques divisions en nombre limité (*fig. 1*).

D) Discussion

Nous avons montré que le poids d'une tumeur est une fonction croissante du nombre de bactéries inoculées. Cet effet porte apparemment sur le nombre de cellules induites et non sur leur vitesse de croissance.

Nous avons, en outre, cherché à comparer l'ordre de grandeur de l'inoculum suffisant pour obtenir le poids maximum des tumeurs (10^5 bactéries) au nombre total de cellules conditionnées, que nous avons évalué selon deux méthodes :

1° La première repose sur la détermination des dimensions de la blessure. Celle-ci a la forme d'un cylindre de diamètre 1,5 mm et de hauteur 2 mm. D'après les microradiographies de MANIGAULT et SALMON (1956) [125], les cellules sont conditionnées jusqu'à une distance approximative de 500 μ en partant de la surface de la blessure. Le volume de l'ensemble des cellules conditionnées occupe 2 à 3 mm³, et le volume moyen des cellules étant compris entre (20 μ)³ et (40 μ)³, le nombre de cellules conditionnées est de $3 \cdot 10^4$ à $4 \cdot 10^5$;

2° La deuxième méthode repose sur la détermination du poids maximum des tumeurs obtenues en un mois qui est de l'ordre de 40 à 80 cg. Le poids des tumeurs augmentant de façon sensiblement exponentielle en fonction du temps en doublant tous les cinq jours (*tabl. 6*), on peut estimer que le poids initial des cellules induites est compris entre 10 et 30 mg. Les cellules ont pour densité une valeur voisine de 1 et un volume compris entre (20 μ)³ et (40 μ)³. On en conclut que le nombre des cellules conditionnées est compris entre 10^5 et 10^6 .

Ces deux estimations indépendantes ont en commun les valeurs de 10^5 à $4 \cdot 10^5$ cellules conditionnées, et nous prendrons celle de 10^5 par la suite, ce nombre n'étant donné qu'en tant qu'ordre de grandeur. Nous savons qu'un inoculum de 10^5 bactéries est suffisant pour induire l'ensemble des cellules conditionnées. On pourrait alors penser qu'en moyenne une bactérie induit une cellule végétale et on devrait s'attendre à obtenir une relation de proportionnalité entre poids des tumeurs et nombre des bactéries inoculées. Cependant, ce n'est pas le cas, tout au moins dans le domaine où le poids des tumeurs se situe entre 20 %

et 100 % du poids maximum. Dans le chapitre suivant, nous avancerons diverses hypothèses susceptibles d'expliquer cette contradiction apparente.

2° HYPOTHESES SUR L'EFFICACITE DE LA BACTERIE

Dans l'étude expérimentale précédemment décrite, les bactéries sont inoculées en nombre limité, mais on laisse s'accomplir intégralement la transformation tumorale des cellules végétales. Il en résulte que la relation obtenue donne le nombre (relatif) des cellules induites en fonction du nombre de bactéries inoculées, le nombre de cellules conditionnées étant constant et indépendant de la présence de la bactérie, les blessures étant faites dans les mêmes conditions. Les différences dans les hypothèses sur l'efficacité de la bactérie ne peuvent guère porter que sur le mode de répartition des bactéries *in situ* (dans le voisinage des cellules conditionnées) ainsi que sur la façon dont le P.I.T. est transmis à la cellule végétale.

Hypothèse I

Considérons d'abord le cas où les bactéries *in situ* ne sont pas mobiles. On peut alors prévoir que, dans un certain domaine, le poids des tumeurs ne sera pas proportionnel au nombre des bactéries inoculées. En effet, la probabilité qu'a une bactérie de se trouver dans un site voisin des cellules conditionnées non occupé par une autre bactérie est d'autant plus faible que l'inoculum est plus grand. On doit constater qu'il faut plus d'une bactérie pour que tous les sites soient occupés par au moins une bactérie, et nous avons essayé de prévoir quantitativement cet effet.

La probabilité d'induire une cellule conditionnée est d'autant plus faible que la proportion de cellules déjà induites est plus grande. Si l'on admet qu'il existe une relation de proportionnalité entre ces deux grandeurs, pour une augmentation dn du nombre n des bactéries inoculées, l'augmentation dN du nombre de cellules induites est donné par la relation (1). R étant la proportion de cellules induites et p une constante.

$$(1) \quad dN = p (1-R) \, dn$$

L'intégration de cette équation donne :

$$(2) \quad \text{Log } (1-R) = pn$$

La courbe représentative de la fonction de la formule (2) est telle qu'elle ne coïncide pas avec celle qui est déterminée par l'expérience. En effet, si l'on se reporte à la figure 4, on constate que pour obtenir une augmentation de R de 10 à 50 % il faut multiplier le nombre des bactéries par 12,1, alors que la for-

mule (2) indique qu'il suffirait de multiplier ce nombre par 6,5. Le même désaccord subsiste si l'on considère une augmentation de R de 10 à 90 % : le nombre déterminé expérimentalement est de 100, celui calculé par la formule 2 n'est que 22.

Quelles sont les conséquences de ce désaccord ? Pour établir la relation (2), nous avons supposé que d'une part les bactéries ne sont pas mobiles, et que d'autre part il existe une relation de proportionnalité entre la probabilité d'induire une cellule conditionnée et la proportion de cellules conditionnées non déjà induites. Cette dernière proposition est équivalente à celle selon laquelle la répartition des bactéries *efficaces* (dans le voisinage des cellules conditionnées) est indépendante du nombre de bactéries inoculées.

Compte tenu de ce que d'une part, la bactérie *in situ* reste viable, même inoculée en faible nombre (10^3), d'autre part l'état de conditionnement s'établit, comme BRAUN [29] l'a démontré, indépendamment de la présence de la bactérie, il ne nous apparaît pas vraisemblable de supposer que le mode de répartition des bactéries efficaces puisse dépendre du nombre des bactéries inoculées. Un autre argument justifiant la relation linéaire utilisée est que la répartition des cellules bactériennes comme celle des cellules conditionnées dépendent vraisemblablement, et de façon concomitante, de la forme de la blessure.

Ces remarques justifient la relation de proportionnalité prise dans la formule (1) et le désaccord entre les résultats expérimentaux et ceux prévus selon la formule (2) impliquerait donc que les bactéries *in situ* sont mobiles.

Sans préjuger du mode de la mobilité apparente des bactéries *in situ*, il convient de rappeler que celles cultivées *in vitro* sont mobiles. Par ailleurs, RIKER (1923) [138] au moyen de techniques histologiques signale que les bactéries envahissent tout le voisinage de la plaie. STONIER (1956) [154] utilisant des bactéries marquées par le ^{32}P confirme ce résultat, et décèle la présence de la bactérie dans de nombreux méats. Enfin la durée de l'état de conditionnement est relativement longue puisqu'elle représente 4 à 5 temps de doublement des bactéries *in situ*.

Nous nous placerons donc dans le cas où les bactéries *in situ* sont mobiles. On peut se demander alors si la non-proportionnalité entre poids des tumeurs et nombre de bactéries inoculées ne résulte pas du mode de division des bactéries, que nous avons décrit au chapitre précédent. En effet, par suite de la limitation de la population bactérienne, le nombre de bactéries efficaces pourrait ne pas être proportionnel au nombre de bactéries inoculées lorsque l'inoculum est tel que les bactéries ne sont pas en croissance active durant toute la période du conditionnement.

Nous envisagerons successivement deux hypothèses sur le mode d'action de la bactérie.

Hypothèse II

La bactérie *in situ* transmet constamment le P.I.T. à une cellule conditionnée avec une probabilité voisine de 1 même dans un temps court devant celui du conditionnement. La vitesse de croissance de la cellule ultérieurement transformée ne dépend pas du moment de la période du conditionnement où le P.I.T. a été transféré.

Dans ce cas, on doit s'attendre à ce que le nombre de bactéries efficaces soit égal au nombre maximum de bactéries présentes durant le conditionnement. Nous savons que le nombre de cellules conditionnées est de l'ordre de 10^5 . En tenant compte de la durée du conditionnement (qui s'étend jusqu'au 4^e jour après la formation de la blessure) et de la vitesse à laquelle les bactéries se multiplient (une division en 12 heures), on peut estimer selon l'hypothèse avancée que l'inoculation de $2 \cdot 10^3$ bactéries suffirait à induire finalement la totalité des cellules conditionnées. Il a été démontré expérimentalement qu'il en fallait approximativement 50 fois plus. Cette contradiction nous conduit à rejeter l'hypothèse II.

Hypothèse III

Le nombre de bactéries efficaces est égal au nombre *moyen*, par rapport au temps, de bactéries présentes durant la période du conditionnement. La vitesse de croissance de la cellule ultérieurement transformée ne dépend pas du moment de la période du conditionnement où le P.I.T. a été transféré.

Durant l'intervalle de temps dt , l'augmentation dN du nombre N des cellules induites est alors donnée par :

$$(3) \quad dN = kn(t) \frac{dt}{T}$$

$n(t)$ étant le nombre de bactéries *in situ* à l'instant t et k une constante. Pour simplifier, nous admettrons que le conditionnement est un phénomène de tout ou rien qui s'étend de l'instant T à l'instant $T_0 + T$. Le nombre N de cellules induites est alors donné par, au facteur k près :

$$(4) \quad N = \int_T^{T_0+T} n(t) \frac{dt}{T}$$

Soit τ le temps de doublement des bactéries à l'instant t (inoculation au temps, $t = 0$) est donné par :

$$(5) \quad n(t) = n_0 2^{t/\tau}$$

n_0 étant le nombre de bactéries inoculées. La population bactérienne ne dépasse pas la valeur limitante n_m qui est atteinte à l'instant t_m donné par :

$$(6) \quad n_m = n_0 2^{t_m/\tau}$$

Compte tenu du nombre n_m limité de la population bactérienne, il est clair que le nombre de cellules induites ne sera proportionnel au nombre n_0 de bactéries inoculées que lorsque :

$$(7) \quad \frac{n_0}{n_m} < 2^{-(T_0 + T)/\tau}$$

les bactéries étant alors constamment en croissance exponentielle durant toute la phase de conditionnement. Le nombre de cellules induites sera indépendant de l'inoculum pour des valeurs de n_0 telles que :

$$(8) \quad \frac{n_0}{n_m} > 2^{-T_0/\tau}$$

Pour les valeurs de n_0 intermédiaires, le nombre N de cellules induites est donné par :

$$(9) \quad N(n_0) = \frac{1}{T} \int_{T_0}^{t_m} \frac{1}{n_0} 2^{\frac{t}{\tau}} dt + \frac{1}{T} \int_{t_m}^{T_0+T} \frac{1}{n_m} dt$$

t_m étant donné par la relation (6). En posant :

$$(10) \quad D = \frac{n_0}{n_m} 2^{-T_0/\tau}$$

on intègre l'équation (9), ce qui donne :

$$(11) \quad R = \frac{N(D)}{n_m} = 1 - \frac{\tau}{T} \left[3,32 \log \frac{1}{D} - 1,44 (1-D) \right]$$

n_m étant du même ordre de grandeur que le nombre de cellules conditionnées. Nous avons représenté (*fig. 7*), les courbes donnant

R en fonction de D pour différentes valeurs du paramètre $\frac{\tau}{T}$.

Les courbes obtenues pour différentes valeurs de T_0 se déduisent de celles représentées par translation de module $\frac{T_0}{\tau} \log 2$ le long

de l'axe des abscisses, ce qui ne modifie pas l'allure des courbes. On voit que le nombre de cellules induites s'écarte d'autant plus

de la proportionnalité avec le nombre de bactéries inoculées que le rapport $\frac{\tau}{T}$ est plus petit.

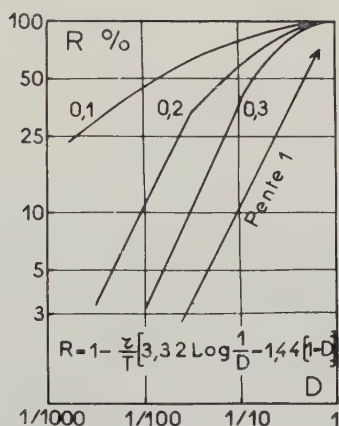


FIG. 7. — Relation théorique entre le nombre de cellules induites et la dilution de l'inoculum

En ordonnées : % de cellules induites. En abscisses : dilution de l'inoculum. Les valeurs indiquées sur la figure sont celles du paramètre $\frac{\tau}{T}$, τ étant le temps de doublement des bactéries *in situ* et T celui de la durée du conditionnement.

La comparaison entre cette courbe théorique et celle de la fig. 4 montre que celle-ci coïncide approximativement avec la courbe théorique quand la valeur du paramètre $\frac{\tau}{T}$ est voisine de 0,2. Au contraire la concordance est mauvaise pour les valeurs 0,1 ou 0,3. Il s'agit donc d'évaluer, indépendamment de ces résultats, le rapport $\frac{\tau}{T}$. Le temps τ de doublement des bactéries est égal à 10 à 12 heures, alors que T (durée du conditionnement) est égal à 50 à 60 heures. La valeur du rapport $\frac{\tau}{T}$ est donc environ de 0,2 en accord avec celle précédemment déterminée.

L'accord entre résultats expérimentaux et ceux prévus à partir de la formule (3) permet de penser que le nombre de bactéries efficaces est égal au nombre moyen (en fonction du temps) de

bactéries présentes dans la plaie durant l'état de conditionnement. La relation (3) est équivalente à celle selon laquelle la probabilité qu'a une bactérie de transformer une cellule conditionnée est *proportionnelle* à la durée de présence de celle-ci, ou que la probabilité qu'a une bactérie, durant un intervalle de temps dt , d'induire une cellule conditionnée est la même, quel que soit le moment considéré durant la période du conditionnement. On doit s'attendre à une telle relation dans l'hypothèse vraisemblable que seuls certains sites (extracellulaires) permettent à la bactérie d'être efficace : ces sites étant occupés, ou non, indépendamment de l'état du conditionnement. L'hypothèse annexe selon laquelle la vitesse de croissance de la cellule ultérieurement transformée ne dépend pas du moment de la période du conditionnement où le P.I.T. a été transféré pourrait paraître, par contre, inexacte. Nous la justifierons au cours de la discussion qui suit.

3° DISCUSSION DU CHAPITRE II

Nous avons cherché à définir la relation qui existe entre le poids des tumeurs et le nombre des bactéries inoculées. Les résultats obtenus avec les bactéries B6 et B6 met⁻ (qui ne sont pas carencées *in situ*) montrent que *le poids des tumeurs est une fonction croissante du nombre des bactéries inoculées pour des inoculums inférieurs à approximativement 10⁵ bactéries par blessure*. Cette conclusion est en désaccord avec celles de LEVINE (1922) [106] et de HILDEBRANDT (1942) [74], selon lesquels il n'y aurait pas d'influence du nombre des bactéries inoculées sur la taille des tumeurs formées. Les résultats de LEVINE sont rapportés trop brièvement pour pouvoir être comparés aux nôtres. La technique employée par HILDEBRANDT a consisté à inoculer un nombre très limité (1 à 100) de cellules bactériennes. Il a pu notamment être montré ainsi que l'infection par une seule bactérie provoque la formation d'une tumeur. Cette technique est cependant insuffisante pour pouvoir mettre en évidence un effet (quantitatif) de la taille de l'inoculum : des tumeurs ne sont obtenues que dans un nombre limité de cas, et l'auteur évalue le pourcentage d'apparition de tumeurs qui ne mesure en fait que la probabilité d'avoir au moins une bactérie efficace. Dans le cas de nos expériences, cette fréquence est très voisine de 100 %, quel que soit le poids des tumeurs, les très rares écarts résultant probablement de fautes techniques. Nous nous sommes attachés à des durées d'observation courtes (quatre semaines) pour que toutes les tumeurs soient encore en croissance active et nous avons comparé les effets de faibles inoculums (10³ bactéries par blessure et plus) à ceux obtenus avec des inoculums suffisamment forts

(supérieurs à 10^5 bactéries) pour induire l'ensemble des cellules conditionnées dont le nombre reste constant.

Nos résultats montrent que, compte tenu de la mobilité probable des bactéries *in situ*, le poids des tumeurs apparaît comme proportionnel au nombre moyen (en fonction du temps) des bactéries présentes dans la plaie durant l'état de conditionnement. Le fait que l'on n'obtienne pas une relation de proportionnalité entre nombre de bactéries inoculées et poids des tumeurs obtenues (pour des valeurs comprises entre 20 % et 100 % du poids maximum) résulterait de ce que le nombre moyen déjà défini n'est pas proportionnel au nombre de bactéries inoculées par suite des divisions limitées des bactéries *in situ*.

L'efficacité de la bactérie est définie comme étant le rapport entre le nombre (moyen) des bactéries et le nombre de cellules conditionnées qu'elles transforment. Nos résultats montrent que l'efficacité de la bactérie est voisine de 1, cette estimation étant donnée à un facteur 10 près. Ces résultats impliquent qu'une bactérie, présente dans la plaie durant toute la période du conditionnement, suffit à induire une cellule végétale. La comparaison entre le nombre des bactéries suffisantes pour obtenir le poids maximum des tumeurs (10^5) et l'évaluation du nombre des cellules conditionnées montre en effet que ces deux nombres sont approximativement égaux. Ces résultats illustrent l'efficacité de la bactérie, puisqu'ils excluent l'hypothèse selon laquelle plusieurs bactéries seraient simultanément nécessaires pour transformer une seule cellule conditionnée.

L'accord entre résultats expérimentaux et ceux prévus *a priori* repose sur l'hypothèse que la vitesse de croissance de la cellule induite ne dépend pas du moment où le P.I.T. lui a été transféré : en agissant plus ou moins longtemps durant la période du conditionnement, les bactéries transforment plus ou moins de cellules conditionnées mais la vitesse de croissance de ces cellules reste la même. Ce postulat peut paraître inexact lorsqu'on sait que BRAUN [24, 26, 28], en limitant la durée d'action de la bactérie par une élévation de la température, obtient des tumeurs dont la vitesse de croissance est modifiée de façon stable. Comment expliquer cette contradiction apparente ?

Dans le cas de nos expériences, les bactéries sont inoculées (en nombre limité) dès le début de la période du conditionnement. Il en résulte que, dans toutes les tumeurs et quelle que soit leur taille, il existe un certain nombre de cellules qui ont été transformées en ayant subi l'action de la bactérie durant toute la période du conditionnement. Ces cellules ont une vitesse de croissance rapide et élaborent, comme on le sait, des phytohormones de croissance qui diffusent à l'extérieur. Les cellules transformées ultérieurement durant la période du conditionne-

ment devraient proliférer lentement. Mais les phytohormones produites par les cellules tumorales se divisant rapidement, provoquent leur prolifération active. Pour démontrer que tel est bien le cas, il serait nécessaire d'isoler ces cellules et d'étudier leur vitesse de croissance. Nous n'avons pas abordé cette étude, mais nous montrerons (chap. III, tabl. 10) que les tumeurs induites par les bactéries tumorigènes inoculées même en faible nombre sont néanmoins capables de provoquer la prolifération (rapide) de cellules tumorales (induites par la souche atténuée A66) dont la vitesse de croissance est lente. On peut donc justifier ainsi par ces résultats l'hypothèse avancée.

Remarquons qu'il en serait sans doute autrement si, au lieu d'inoculer les bactéries en nombre variable ainsi que nous l'avons fait, on inoculait un nombre défini de bactéries, mais à différents moments après la formation de la blessure. Les tumeurs obtenues ainsi différeraient entre elles par leur vitesse de croissance (et peut-être aussi par le nombre de cellules induites), et l'hypothèse faite selon laquelle la vitesse de croissance de la cellule ne dépend pas du moment du conditionnement ne pourrait probablement plus être justifiée.

Les bactéries B6 ileu⁻ val⁻ provoquent des tumeurs de taille significativement plus petite que celles produites par B6. Elles ne sont pas des mutants atténués, mais elles n'expriment pas, étant carencées *in situ*, leur pouvoir tumorigène. Les tumeurs produites par B6 ayant une vitesse de croissance voisine de celles produites par B6 ileu⁻ val⁻, on en déduit que celles-ci sont incapables d'induire la *totalité* des cellules conditionnées. Même en multipliant par 50 le nombre de ces bactéries dans l'inoculum, les résultats sont inchangés, ce qui montre que pour être efficace, non seulement la bactérie *in situ* doit être viable, mais qu'elle doit de plus être capable d'effectuer certaines biosynthèses dont la nature reste inconnue. Ils suggèrent que le P.I.T. est élaboré préférentiellement par les bactéries *in situ*. D'autres auteurs semblent obtenir par une méthode différente un résultat analogue avec d'autres mutants auxotrophes (LIPPINCOTT et LIPPINCOTT) [114].

CHAPITRE III

ETUDE DES PROPRIETES PHYTOPATHOGENES DES BACTERIES DES SOUCHES ATTENUÉES

Nous avons étudié précédemment une relation qui exprime la variation du poids des tumeurs en fonction du nombre de bactéries contenues dans l'inoculum. Il existe une autre cause de la diminution du poids des tumeurs. Elle est imputable à des mutations qui altèrent les propriétés phytopathogènes de la souche parente. L'intérêt que présente l'étude des souches mutantes réside dans le fait que seule l'élaboration ou la transmission du P.I.T. sont apparemment modifiées à la suite de la mutation.

Nous envisagerons de façon très succincte la morphologie et l'histologie des hyperplasies produites après inoculation de la plante (*datura*, topinambour) par les bactéries des différentes souches étudiées. Nous essaierons de caractériser leur pouvoir tumorigène éventuel en procédant à l'inoculation de cals auxiniques de tomate et de *datura* ainsi qu'en étudiant de façon quantitative la taille des tumeurs résultant de l'inoculation conjointe de bactéries atténuées et tumorigènes, ces dernières étant inoculées en nombre limité.

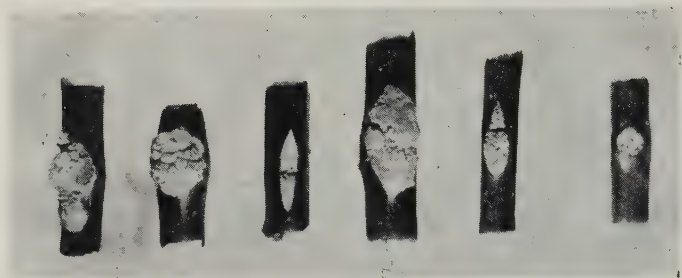
1° Inoculation à des tiges de plantes de *datura* (*Datura stramonium* L.) et à des explantats primaires de topinambour (*Helianthus tuberosus* L.).

MORPHOLOGIE

Les souches A6, B6 et son mutant S1 (résistant à la streptomycine) ne se distinguent en rien quant à la formation des tumeurs. Celles-ci apparaissent en deux semaines après l'inoculation en une hyperplasie extrusive d'aspect homogène qui se développe jusqu'à la mort de la plante (*planche 1*).

Par contre, l'infection par les souches M39 et 5 Gly ne provoque, dans les mêmes conditions, que des hyperplasies de taille limitée. Une excroissance est nettement visible après l'inoculation de la tige de *datura*, mais est seulement visible à la loupe

PLANCHE I



*Tiges de Datura stramonium inoculées par les bactéries
des différentes souches étudiées*

De gauche à droite : Souches B6, S1, M39, A6, A66 et 5 Gly

Photographie : 28 jours après l'inoculation (échelle : 0,75 ×)

après inoculation du tubercule de topinambour (explantat primaire en culture de tissu). L'excroissance disparaît deux semaines plus tard, par nécrose. Le développement de cette hyperplasie (tige de datura) semble d'ailleurs lié à une humidification suffisante de la serre (supérieure à 60 %). Les tissus néo-formés sont beaucoup plus friables et semblent contenir plus d'eau que les tissus tumoraux, ce qui est un caractère qui les rapprocherait des tissus hyperauxiniques.

La souche A66 provoque la formation d'une hyperplasie de taille réduite, mais il ne se produit pas d'arrêt ultérieur dans la prolifération, comme cela est le cas pour les hyperplasies provoquées par M39 et 5 Gly. Dans le cas de l'inoculation de la tige de datura, la taille de l'hyperplasie est plus grande si l'inoculation est faite à proximité d'un bourgeon [35].

HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE

L'histologie et la cytologie des tumeurs végétales ont donné lieu à de nombreux travaux [100, 123, 139], et nous en reprendrons les caractères principaux en vue de comparer entre elles les proliférations obtenues après inoculation des différentes souches (*tabl. 8*). Les hyperplasies obtenues après inoculation des bactéries de la souche A66 présentent de nombreux caractères communs à ceux de la souche parente, alors que celles résultant de l'inoculation des souches 5 Gly et M39 s'en distinguent nettement.

Discussion

On définit généralement le caractère tumoral d'une hyperplasie par l'établissement des deux propriétés suivantes :

TABLÉAU 8

Caractères des réactions induites par les bactéries des différentes souches

CARACTÈRES ANALYSÉS	FLESSURE INFECTÉE PAR			TÉMOIN (BLESSURES NON INFECTÉES)
	A6, B6 S1	A66	5 Gly, M39	
Proportion de cellules en division (mitoses, re-cloisonnements)	Très élevée	Très élevée	Nettement moins élevée	Les divisions sont limitées au recloisonnement de cicatrisation (première semaine)
Recloisonnements orientés par la blessure.	Non orientés par la blessure	Non orientés par la blessure	Une partie des recloisonnements est orientée par la blessure	Tous les recloisonnements sont orientés
Vaisseaux anarchiques (ligneux) néo-formés...	Nombreux	Présents en moins grand nombre	Pas de vaisseaux néoformés	Pas de vaisseaux néoformés
Réaction de l'anneau vasculaire (hypertrophie)	Forte	Forte	Forte	Faible
Cellules géantes	Présentes	Présentes	Présentes surtout à la périphérie de la tumeur	Absentes
Noyaux anormaux avec parfois plusieurs nucléoles	Présents	Présents	Présents	Absents

1° La prolifération est indépendante de la présence de la bactérie ;

2° La prolifération par greffe est illimitée.

Dans quelle mesure les hyperplasies décrites sont-elles des tumeurs ? En ce qui concerne les proliférations induites par les souches A6 et B6, la réponse est claire. En effet, ces souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sont celles qui ont été utilisées pour la mise en évidence des propriétés caractéristiques du tissu tumoral. La souche S1, qui provoque des hyperplasies en tout point comparables à celles induites par A6 ou B6 montre que l'acquisition de la résistance à la streptomycine n'a pas modifié le pouvoir tumorigène de la souche, résultat en accord avec ceux déjà obtenus [98, 134].

Les proliférations induites par A66 répondent également à la définition du caractère tumoral. BRAUN et LASKARIS [35] ont montré que ces hyperplasies sont greffables et que la bactérie peut même être éliminée à la suite des greffes successives. Elles possèdent toutes les propriétés caractéristiques du tissu tumoral, mais leur vitesse de croissance est notablement plus faible. Ceci justifie le qualificatif de « semi-virulente » ou d'atténuée généralement donné à cette souche.

Les souches M39 et 5 Gly pourraient être qualifiées de non-tumorigènes, car les proliférations qu'elles provoquent s'arrêtent rapidement et ne sont donc pas illimitées. Ces hyperplasies pourraient être caractéristiques d'une transformation tumorale incomplète si on pouvait leur conférer des propriétés distinctives de celles du tissu sain comme on sait le faire en élevant la vitesse de croissance des tumeurs provoquées par A66 au moyen d'un apport de phytohormones au point d'inoculation [116, 35]. Nous avons donc entrepris des expériences analogues en utilisant deux techniques différentes.

2° Inoculation des cals auxiniques

On confirme les propriétés déjà établies de la souche A66. En présence d'un apport exogène ou endogène d'auxines (et sans doute d'autres substances), les tumeurs induites par A66 atteignent une taille égale à celle des tumeurs que produit A6 (souche parente) dans les mêmes conditions (*planches 2 et 3*). Rappelons que les tumeurs se distinguent aisément des cals, non seulement par la taille, mais également par l'aspect des tissus. Par contre, en ce qui concerne M39 et 5 Gly, il n'a pas été possible de mettre en évidence une excroissance ayant des caractères distinctifs de ceux du cal auxinique témoin (*tabl. 9*). L'addition d'A.I.A. ($5 \cdot 10^{-4}$ g/l) ou celle simultanée, du lait de coco (10 %), de la vitamine B1 (10^{-3} g/l) et de l'acide naphthalène acétique

PLANCHE 2



Cals auxiniques de tige de tomate inoculés par les bactéries des différentes souches

De gauche à droite : Témoin (non inoculé), A66, M39, 5 Gly, B6. Photographie : 6 semaines après l'inoculation (échelle : 0,33 ×)

PLANCHE 3



Cals auxiniques de tiges de datura inoculés par les bactéries des différentes souches

De gauche à droite : Témoin (non inoculé), B6, M39, A6, 5 Gly, A66. Fragments de tiges cultivés, sens inversé, sur milieu de HELLER. Photographie : 36 jours après l'inoculation (échelle : 0,5 ×).

TABLEAU 9

SOUCHE BACTÉRIENNE inoculée	NOMBRE DE CALS auxiniques	NOMBRE DE TUMEURS	NOMBRE TOTAL de tiges
Témoin sans inoculation	18	0	18
B6	0	44	44
A6	1	20	21
5 Gly	41	0	41
A66	2	25	27
M39	43	0	43

Nombre de tumeurs formées après inoculation à des tiges de datura cultivées in vitro

*Tiges cultivées sur milieu de HELLER et placées en sens inversé.
Observation un mois après l'inoculation*

(2.10^{-4} g/l) ne permet pas de provoquer une prolifération des tissus infectés par les bactéries M39 ou 5 Gly, distincte de celle des cals témoins.

Ces expériences montrent qu'il existe deux catégories de mutants qui se distinguent entre eux par la nature des hyperplasies qu'ils provoquent.

3° Inoculations mixtes des différentes souches mutantes et tumorigènes

L'existence démontrée de deux catégories différentes de mutants nous a incités à observer les effets d'inoculations simultanées.

Les résultats obtenus après inoculation à la tige de datura nous ont montré que l'inoculation mixte de souches atténuées ne permet pas de provoquer une prolifération distincte de celle obtenue avec les souches inoculées isolément.

Nous avons alors recherché les effets des tissus tumoraux (provoqués par la souche parente) sur le développement des tissus induits par les bactéries atténuées. A cet effet, nous avons réalisé une infection mixte telle que toutes les cellules conditionnées pouvaient être induites par les bactéries atténuées (inoculées en grand nombre) alors que seule une partie d'entre elles étaient transformées par les bactéries tumorigènes parentes (inoculées en nombre limité).

On sait que le tissu tumoral produit en excès certaines hormones qui diffusent vers les tissus immédiatement voisins, sans provoquer cependant de modifications morphologiques importantes du tissu sain avoisinant, probablement parce qu'elles sont rapidement dégradées. En serait-il autrement si ce tissu (conditionné) était préalablement infecté par des bactéries atténuées ? Nous avons déjà vérifié que la présence de phytohormones provoque la prolifération rapide de cellules tumorales induites par A66. Dans ce cas on devrait s'attendre à ce que la plupart des cellules (induites par A66) prolifèrent activement à la suite de la production concomitante de phytohormones par les cellules tumorales (induites par les bactéries parentes A6). On pouvait espérer mettre en évidence ce phénomène en comparant le poids des tumeurs obtenues à la suite de l'infection mixte à la somme des poids des tumeurs résultant des inoculations séparées.

★
★ ★

Pour chaque expérience, 40 plantes sont blessées, dont 20 sont inoculées au moyen d'une suspension dense des bactéries atténuées. Quelques heures ou un jour après, les bactéries tumo-

TABLEAU 10

SERIE	n	ΣP	σ^2	M	i	F	t
A6 1:2	20	9 883	106 197	491	152	1,39 N.S.	2,47 *
A66+A6 1:2	20	14 556	76 509	728	129		
A6 1:10	20	5 437	12 377	272	52	6,50 **	4,62 **
A66+A6 1:10	18	10 612	80 730	589	141		
A6 1:30	20	5 743	13 355	287	54	11,22 **	3,31 **
A66+A6 1:30	20	11 449	149 229	572	81		
A6 1:90	20	7 116	44 918	355	99	1,77 N.S.	1,05 N.S.
A66+A6 1:90	20	8 343	25 423	417	75		
A6 1:270	20	3 559	9 001	178	44	2,62 *	4,34 **
A66+A6 1:270	20	7 054	23 598	353	72		
A6 1:540	20	2 504	5 311	125	34	4,04 **	3,75 **
A66+A6 1:540	20	5 246	21 406	262	68		
A6 1:1000	20	1 887	1 137	94	16	62,40 **	4,50 **
A66+A6 1:1000	20	7 302	70 735	365	59		
A66	60	8 907	4 836	148	18		

Comparaison entre le poids des tumeurs obtenues à la suite de l'inoculation de A6 et A66 d'une part, et A6 d'autre part

Résultats exprimés en mg (poids des trois tumeurs d'une plante). La valeur de 148 mg (représentant le poids moyen des trois tumeurs résultant de l'inoculation par A66 inoculé seul) a été systématiquement retranchée des poids des tumeurs obtenues après l'inoculation mixte des bactéries A6+A66. Symboles : N.S. : F ou t non significatif au seuil de 5 %; * : F ou t significatif au seuil de 5 %, et ** : F ou t significatif au seuil de 1 %.

TABLEAU 11

SERIE	n	ΣP	σ^2	M	i	t
M39+B6 N.D.	15	2961	4 093	197	36	1,39 N.S.
B6 N.D.	14	2 323	3 338	166	33	
M39+B6 1:10	14	1 869	1 844	134	25	0,71 N.S.
B6 1:10	15	1 784	4 075	119	36	
M39+B6 1:100	15	756	1 474	51	22	0,80 N.S.
B6 1:100	15	911	753	61	16	
5 GLY+B6 N.D.	14	2118	1 854	151	25	1,56 N.S.
B6 N.D.	15	1 884	2 098	126	26	
5 GLY+B6 1:10	15	2 245	3 459	150	34	1,58 N.S.
B6 1:10	15	2 745	3 203	183	32	
5 GLY+B6 1:100	14	851	601	61	14	1,09 N.S.
B6 1:100	15	1 066	674	71	15	

Comparaison entre le poids des tumeurs obtenues à la suite de l'inoculation de B6 et M39 ou B6 et 5 Gly d'une part, et B6 d'autre part

Résultats exprimés en mg (poids des trois tumeurs d'une plante).

Pour l'explication des symboles, voir la légende des tableaux 4 et 10.

Poids mesurés 3 semaines après l'inoculation (B6 non dilué) ou 7 semaines après (B6 dilué 1 : 10 et 1 : 100).

rigènes sont inoculées en nombre limitant dans les blessures des 40 plantes de l'expérience. Un mois plus tard, les tumeurs sont pesées.

Le poids des trois tumeurs d'une plante inoculée par A66 seul a été mesuré (sur 60 plantes) et évalué à $148 \pm 18^*$ mg. Ce poids moyen a été retranché des poids correspondant aux inoculations mixtes de A66 et A6. L'ensemble des résultats est représenté tableau 10 : le poids moyen des tumeurs obtenues à la suite de l'inoculation mixte A66 + A6 est toujours supérieur à la somme des poids obtenus par inoculation séparée de A6 et A66. Ces différences sont significatives dans six cas sur sept.

L'examen du tableau 11 montre par contre que l'inoculation préalable de M39 et 5 Gly n'exerce aucune action favorable (ou défavorable) sur le poids des tumeurs obtenues après la surinfection par la souche tumorigène. On confirme donc les résultats obtenus après inoculation des cals auxiniques.

Les résultats obtenus avec A66 montrent que la présence dans une tumeur de cellules à vitesse de croissance rapide provoque bien la prolifération active de cellules tumorales qui, isolées, se diviseraient lentement. Nous justifions ainsi la remarque faite au cours de la discussion du chap. II.

Par ailleurs, on ne constate pas d'action défavorable de la présence des bactéries atténuées sur la formation des tumeurs induites par les bactéries parentes (surinfectées en faible proportion par rapport à celles mutantes). Ce résultat implique que les bactéries des souches atténuées étudiées n'entrent pas en compétition pour la formation des tumeurs avec les bactéries des souches parentes.

4° Discussion du chapitre III

Les expériences décrites montrent qu'il existe au moins deux catégories de mutants atténués : A66 d'une part, 5 Gly et M39 d'autre part. La première est constituée par des bactéries qui ont conservé le pouvoir oncogène défini par la possibilité d'entretenir par greffes illimitées les proliférations induites. Mais il manque aux cellules qui constituent ces tumeurs (qualitativement ou quantitativement) certains facteurs de croissance nécessaires à leur multiplication rapide. Nous avons pu élever leur vitesse de croissance au niveau de celle des tumeurs induites par les bactéries de la souche parente au moyen de trois techniques différentes : apport de phytohormones exogènes, endogènes ou diffusant du tissu tumoral résultant de l'inoculation mixte par les

* Evaluation de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil de 5 %.

bactéries parentes. La deuxième catégorie, représentée par M39 et 5 Gly, est constituée par des bactéries qui provoquent certaines hyperplasies dont la nature n'apparaît pas tumorale. En effet, ces hyperplasies ne se développent qu'un temps limité (deux à trois semaines) et il ne nous a pas été possible de maintenir leur croissance active par des apports de phytohormones au point d'inoculation.

La conclusion générale que l'on tire est que l'élaboration ou la transmission du P.I.T. peut être modifiée de deux façons différentes au moins, à la suite d'une mutation bactérienne. La perte ou la modification du pouvoir tumorigène des bactéries atténuées étudiées pourrait s'expliquer soit par l'élaboration d'un P.I.T. modifié (différence qualitative) par rapport à celui élaboré par les bactéries de la souche parente, soit par une différence dans la quantité du P.I.T. transmis à la cellule végétale. L'existence démontrée de deux catégories différentes de mutants atténués nous a incité à étudier les propriétés physiologiques des bactéries, cultivées *in vitro*, afin de pouvoir éventuellement mettre en évidence une corrélation entre la modification du pouvoir tumorigène et certaines propriétés biochimiques de ces bactéries.

DEUXIEME PARTIE

Dans cette deuxième partie nous décrirons, comparativement chez des souches bactériennes sauvages tumorigènes et chez leurs mutants atténués, certaines propriétés physiologiques des bactéries cultivées in vitro (chapitre I). La sélection de mutants résistant à la glycine constituant un moyen (empirique) d'obtenir des souches atténuées, nous nous sommes attaché à préciser le mode d'action de cet acide aminé. Nous avons observé une action inhibitrice sur la synthèse des ARN, qui nous a paru suffisamment intéressante pour être étudiée en détail (chapitre II).

CHAPITRE PREMIER

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DES SOUCHES ATTENUÉES CULTIVÉES « IN VITRO »

1. — ETUDE DE LA CROISSANCE

Les souches sauvages tumorigènes A6 et B6 sont prototrophes et utilisent comme source de carbone et d'énergie un grand nombre de substrats (Mc INTIRE *et al.*, 1941) [81]. Les souches atténuées A66 et 5 Gly, isolées de la souche tumorigène A6, n'ont pas été décrites comme étant auxotrophes par les auteurs qui les ont isolées [73, 164]. Lorsque le mutant M39 a été isolé par la méthode à la pénicilline, du mutant S1 résistant à la streptomycine (et lui-même isolé de la souche tumorigène B6) [9], nous avons pensé que le mutant M39 était auxotrophe et que ce caractère était responsable de sa sélection. En réalité, les bactéries M39 se divisent très lentement en milieu minimum avec le glycérol comme source de carbone (temps de « doublement » : 27 heures au lieu de 6 heures pour la souche parente). Ce résultat suggérerait que le mutant M39 n'était pas un mutant auxotrophe, mais n'excluait pas qu'il s'agissait d'un mutant « leaky », dont certaines biosynthèses ne seraient effectuées que de façon limitante pour la croissance. Aussi avons-nous recherché s'il n'existait pas de sources de carbone permettant la croissance de M39, et nous avons étudié comparativement les autres souches atténuées A66 et 5 Gly.

a) SOURCES DE CARBONE UTILISABLES PAR LES BACTÉRIES

Nous avons étudié la croissance des bactéries atténuées en milieu minimum, différentes sources de carbone étant ajoutées séparément au milieu minéral. Aucune croissance des bactéries M39 ne peut être mise en évidence en présence des sucres suivants : glucose, saccharose, méso-inositol, lactose. Les bactéries M39 se divisent activement en présence de lactate, de glutamate, d' α -cétoglutarate, de pyruvate et de gluconate. M39 n'est donc pas

un mutant auxotrophe mais un mutant dont la capacité d'utiliser certaines sources de carbone est modifiée.

Ce résultat nous a conduit à mesurer et à comparer les temps de doublement des souches mutantes en milieu MS en présence de différentes sources de carbone et d'énergie. Les mesures faites (tabl. 12) ne nous ont pas permis de mettre en évidence des

	B6	M39	A6	5 Gly	A66
Glucose 5 ‰.....	2,6	—	3,5	3,6	3,4
Saccharose 5 ‰.....	3,1	—	3,4	3,0	2,9
Glycérol 5 ‰.....	6,0	27	4,2	5,0	4,6
Méso-Inositol 1 ‰.....	2,7	—	4,8	3,9	3,8
Lactate 5 ‰.....	6,2	2,2	3,7	3,5	3,7
Glutamate 2 ‰.....	2,7	2,5	3,8	4,0	3,8
α -Céto-Glutarate 2 ‰.....	+	+	+	+	+
Gluconate 2 ‰.....	+	+	+	+	+
Lactose 2 ‰.....	+	—	+	+	+
Pyruvate 2 ‰.....	+	+	+	+	+

TABL. 12

Temps de doublement (en heures) des différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* selon la source de carbone et d'énergie. Cultures agitées à 30° C.

— : croissance.

— : pas de croissance décelable.

différences significatives dans les temps de doublement des souches atténuées A66 et 5 Gly, isolées de A6. Les bactéries M39 présentent un temps de doublement égal à celui de B6 avec le glutamate; par contre, avec le lactate comme source de carbone, les bactéries M39 se divisent plus rapidement que les bactéries de la souche parente.

Ces résultats ne paraissent pas pouvoir s'expliquer par une incapacité de la souche M39 à métaboliser certains sucres et suggèrent que la pénétration de divers sucres et polyols dans les bactéries M39 a été modifiée. Aussi avons-nous étudié la pénétration du glucose ^{14}C .

b) PÉNÉTRATION DU GLUCOSE ^{14}C DANS LES BACTÉRIES M39

Des cultures (milieu MS-lactate ou glutamate 2 g/l) de B6 et de M39 sont mises en présence de chloramphénicol (250 mg/l) pour arrêter toute synthèse des protéines. On ajoute du glucose ^{14}C à la concentration finale de $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$. A des temps divers, on filtre 1 ml de la culture et on mesure la radioactivité retenue sur le filtre. Le glucose ^{14}C incorporé sous forme acido-insoluble

à froid est également mesuré (fig. 8). La pénétration du glu-

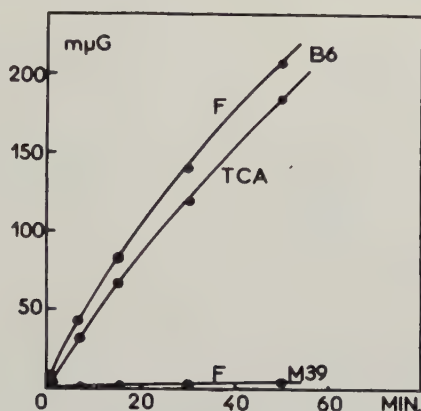


FIG. 8. — Pénétration du glucose ^{14}C dans les bactéries B6 et M39

Mesures par filtration (courbes F) ou après précipitation dans le TCA 5 % (courbe TCA) à 0° C. Résultats exprimés en mpG de glucose ^{14}C par μg de poids sec des bactéries. Milieu M.S. glutamate 2 g/l. Chloramphénicol (250 mg/l) ajouté 9 minutes avant le glucose ^{14}C (4. 10^{-4}M).

cose ^{14}C dans M39 est négligeable, comparée à celle de la souche parente : il y a cinquante fois moins de glucose marqué dans les bactéries M39 que dans les bactéries B6 après 50 minutes d'incubation. De plus, la quantité de glucose ^{14}C incorporée dans les bactéries M39 est significativement plus faible que celle présente sous forme acido-soluble (différence des mesures F et TCA représentées fig. 8) dans les bactéries B6.

★
★★

Cette étude montre que les bactéries M39 se distinguent des bactéries des autres souches atténuées A66 et 5 Gly par une non-utilisation de certains sucres et polyols. En effet, les bactéries M39 ne présentent pas de croissance décelable en présence de nombreux polyols non ionisés. Le fait qu'elles n'incorporent pas de glucose ^{14}C suggère que la non-utilisation de certains substrats est due à une absence de pénétration. Néanmoins, ces résultats n'excluent pas que la mutation présentée par M39 provoque une déficience dans le métabolisme des sucres. En particulier, le lactose n'est pas utilisé, et on pouvait penser que la production de 3-cétolactose (3CL) à partir du lactose (qui, nous l'avons vu, est une propriété caractéristique du genre *Agrobacterium*), pouvait être mise en défaut. Aussi avons-nous étudié la production de 3CL par les bactéries des différentes souches.

2. — PRODUCTION DE 3-CETO-LACTOSE A PARTIR DU LACTOSE

Nous avons étudié de façon qualitative la production de 3-céto-lactose par les bactéries des différentes souches selon la technique de BERNAERTS et DE LEY [16]. Toutes les bactéries, atténuées ou non, en produisent, sauf celles de la souche M39, du moins en quantité décelable. Des différences analogues sont apparues au cours de l'étude de la production de dérivés cétoniques à partir du maltose et du saccharose.

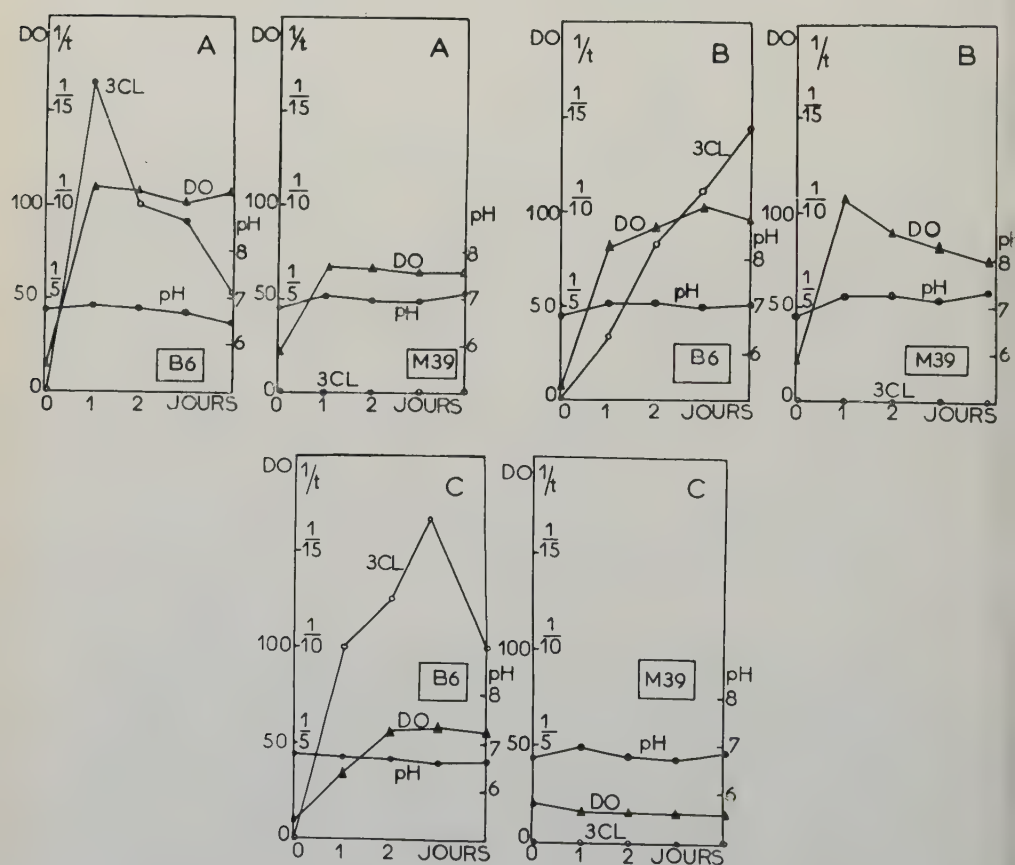


FIG. 9. — Production de 3 céto-lactose par les souches B6 et M39

En ordonnées : densité optique (D.O.), pH et inverse du temps de réduction d'un volume déterminé de liqueur de Fehling (en minute⁻¹) :

A : milieu complexe + lactose 20 g/l;

B : glutamate 2 g/l + lactose 20 g/l;

C : lactose 20 g/l.

Ce résultat, qui a fait l'objet d'une note préliminaire (MANIGAULT et BEAUD) [128] a été mis en doute par FUKUI et HOCHSTER [57]. Ceux-ci ont, en effet, étudié la production de 3 CL par un autre mutant atténué (II BNV6) et ont remarqué que les bactéries de cette souche provoquent un abaissement marqué du pH du milieu de culture, ce qui entraîne une diminution de la quantité de 3 CL produite, ce composé étant instable en milieu acide (ou alcalin). Bien que les auteurs n'aient pas étudié la souche M39, ils concluent que la non-production de 3-céto-lactose par M39 résulte probablement d'une modification trop rapide du pH du milieu de culture. Des contrôles, en milieu liquide, n'ont fait que confirmer nos premiers résultats (*fig. 9*) : la souche M39 n'effectue pas la réaction alors que les autres souches atténuées ont conservé la capacité de produire le 3 CL.

On constate donc que la perte du pouvoir tumorigène de M39 s'accompagne de celle de pouvoir produire le 3-céto-lactose. L'étude des souches A66 et 5 Gly montre cependant que l'atténuation ou la perte apparente de la tumorigénèse n'entraîne pas la perte de pouvoir produire le 3 CL.

En ce qui concerne M39, on se rappellera que les sucres neutres employés ne permettent pas sa croissance (contrairement à la souche parentale) et que, plus précisément, le glucose ^{14}C ne pénètre pas dans les bactéries. Il semble que l'on puisse expliquer l'incapacité à produire le 3 CL par le fait que le lactose ne pénétrerait pas dans la cellule bactérienne. Faute de diholoside radioactif, nous n'avons pu confirmer directement cette hypothèse.

3. — PRODUCTION D'AIA A PARTIR DU TRYPTOPHANE

L'intérêt que présente cette production réside dans le fait que l'AIA est une hormone de croissance qui a été mise en évidence chez de nombreux végétaux. Bien que l'AIA éventuellement produit par la bactérie ne puisse être considéré comme responsable de la prolifération du tissu tumoral, son rôle possible dans la transformation tumorale a été suggéré par KLEIN et LINK [96], mais l'interprétation de leurs résultats a été mise en doute par BRAUN [37]. Aussi avons-nous étudié la production d'AIA à partir du tryptophane par les bactéries étudiées. Nous avons, en outre, effectué des essais en présence de chloramphénicol pour pouvoir mettre éventuellement en évidence le caractère inductible ou constitutif de cette production. Nous avons dosé l'AIA au moyen du réactif de Salikowsky.

1° PRODUCTION D'AIA AU COURS DE LA CROISSANCE

La souche B6 produit, proportionnellement à la concentration du tryptophane ajouté au milieu de culture, des quantités importantes d'AIA qui s'accumulent dans le milieu (*fig. 10*). Il en

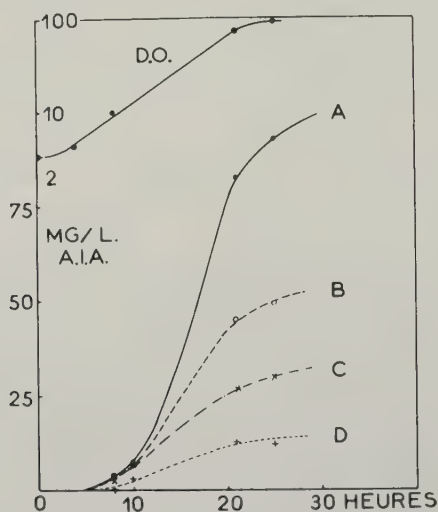


FIG. 10. — Production d'AIA au cours de la croissance

Souche B6 cultivée avec le glycérol (10 g/l) comme source de carbone. D.O. : densité optique de la suspension bactérienne. — Concentration du tryptophane :

A : 1 g/l — B : 0,5 g/l — C : 0,25 g/l — D : 0,1 g/l

est de même pour les souches 5 Gly et A66 et pour la souche parentale A6. La souche M39 se distingue de toutes les autres par son incapacité totale à produire en quantités décelables l'AIA à partir du tryptophane.

2° PRODUCTION D'AIA PAR LES BACTÉRIES EXPOSÉES AU CHLORAMPHÉNICOL

Les souches B6 et A6 produisent des quantités voisines d'AIA que les bactéries aient été cultivées en présence de tryptophane ou non (*tabl. 13*). Les bactéries atténuées 5 Gly et A66 produisent des quantités plus grandes d'AIA si les bactéries ont été préalablement cultivées en présence de tryptophane. Le comportement de M39 est assez inattendu : les bactéries non exposées préalablement au tryptophane produisent l'AIA en quantités décelables, alors que les bactéries cultivées en présence de l'acide aminé n'en produisent pas.

PRÉCULTURE	B6	M39	A6	A66	5 Gly
Milieu M.S. + Glutamate 2 %	7,5 4,6* 4,0 5,0*	3,4 2,7 3,4	8,0 8,6 5,0* 8,0*	8,2 11,2 11,0	8,0 8,1 5,5 5,5
Milieu M.S. + Glutamate 2 % + Tryptophane 1 %	7,8 5,2* 6,1*	0. 0 0	7,0* 10,8 7,0 9,5*	16,5 15,0 17,6	13,5 13,2 11,0 12,5

TABLEAU 13

AIA produit par les bactéries exposées au chloramphénicol (250 mg/l) ajouté 20 minutes avant le tryptophane (1 g/l). Quantités produites en 1 heure. Résultats exprimés en mg/l par 168 µg de poids sec bactérien (plusieurs expériences indépendantes).

* Glucose (5 g/l) utilisé à la place du glutamate.



Les résultats obtenus avec les bactéries B6 et A6 exposées au chloramphénicol en concentrations telles que les synthèses protéiques soient arrêtées, suggèrent que pour les souches B6 et A6, les enzymes catalysant la transformation du tryptophane en AIA sont constitutives. Il en est de même pour les souches A66 et 5 Gly, celles-ci apparaissant cependant comme partiellement inductibles.

Les résultats concernant M39 suggèrent que ces bactéries possèdent l'ensemble des enzymes catalysant la transformation du tryptophane en AIA, mais qu'une enzyme qui dégraderait préférentiellement le tryptophane est induite par l'acide aminé. Le fait que M39 soit capable d'utiliser le tryptophane comme seule source de carbone semble confirmer cette hypothèse. Si tel était le cas, la mutation subie par M39 provoquerait apparemment l'acquisition d'une propriété nouvelle : comment expliquer ce résultat ? Il se pourrait que la tryptophanase éventuellement présente dans les bactéries B6 soit sensible à la répression catabolique [51] et que la mutation subie par M39 supprime indirectement les effets de cette répression, la perte de pouvoir produire l'AIA apparaissant alors comme une conséquence des déficiences précédemment mises en évidence. Le fait que les bactéries B6 ne soient pas capables d'utiliser le tryptophane comme seule source de carbone limite cependant les hypothèses que l'on peut envisager à ce sujet.

4. — SENSIBILITE A LA GLYCINE DES BACTERIES DES SOUCHES ATTENUÉES ET TUMORIGENES

On sait que les acides aminés suivants : glycine, glycyL-glycine, DL alanine, DL sérine, acide DL amino-n-butyrique, DL thréonine, DL norvaline, DL méthionine, DL valine, DL norleucine, DL isoleucine, L leucine, L lysine, ajoutés à des concentrations variant de M/100 à M/20 au milieu de culture inhibent la croissance des bactéries B6 et A6 [164,5]. La sélection de mutants résistants étant le seul moyen (empirique) connu pour isoler des bactéries atténuées, il nous a paru utile d'évaluer la sensibilité à la glycine des souches étudiées.

Nous avons suivi la croissance bactérienne par la mesure de la turbidité de la culture, en exposant les bactéries à la glycine à des concentrations variables. La croissance a été étudiée en milieu complexe (bouillon peptoné « Nutrient broth » Difco 8 g/l) ou en milieu synthétique (milieu MS, glutamate 2 g/l). L'inoculum est tel qu'il y a, au moment de l'exposition à la glycine, 2 à $6 \cdot 10^7$ bactéries par ml.

1° SOUCHES B6 ET M39

En milieu complexe on note une inhibition très importante de la croissance des bactéries B6 pour des concentrations en glycine supérieures ou égales à 0,75 g/l (10^{-2} M). Il n'y a aucun effet décelable à des concentrations en glycine inférieures à 0,25 g/l et une légère inhibition de la croissance totale et de la vitesse

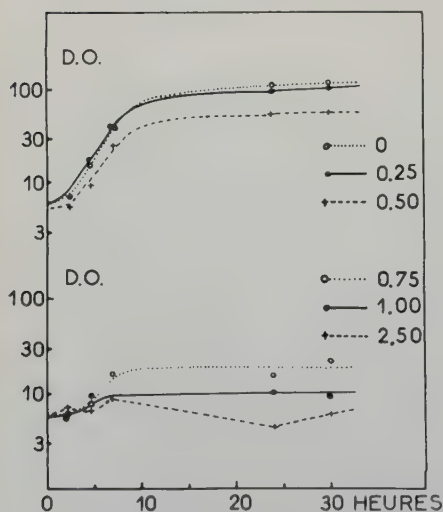


FIG. 11
(Souche B6)

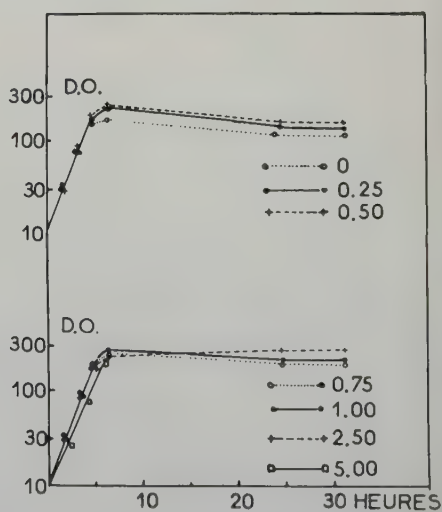


FIG. 12
(Souche M39)

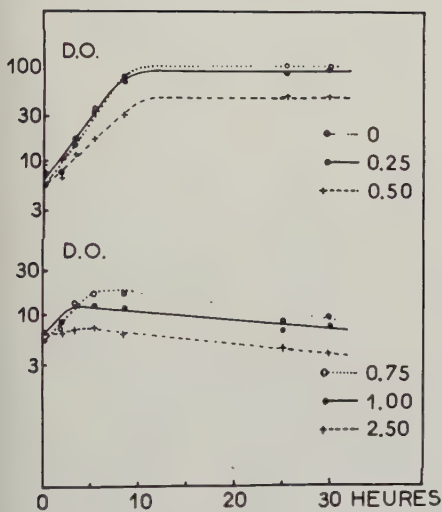


FIG. 13
(Souche A6)

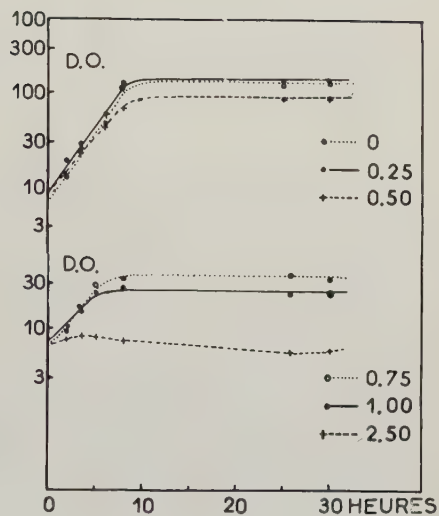


FIG. 14
(Souche A66)

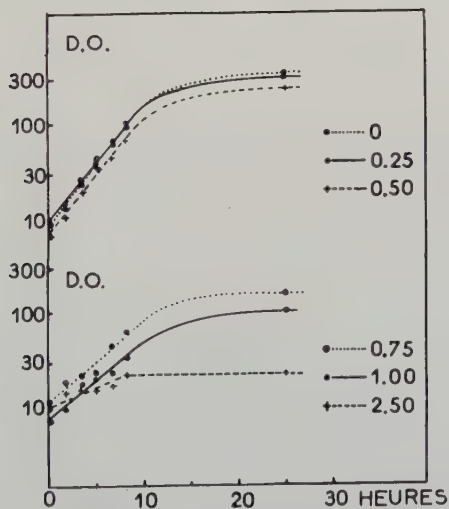


FIG. 15
(Souche 5 Gly)

FIG. 11 à 15. — Courbes de croissance des bactéries exposées à la glycine
Milieu complexe additionné de glycine (en g/l)

de division est notée pour la concentration intermédiaire de 0,5 g/l, sans que la phase de latence initiale soit modifiée (*fig. 11*). Les bactéries M39, par contre, présentent une résistance très élevée à la glycine puisque même à la concentration de 5 g/l une bonne croissance est observée (*fig. 12*).

2° SOUCHES A6, A66, 5 GLY

Les bactéries A6 et A66 présentent la même sensibilité lorsque la glycine est ajoutée en concentration variable au milieu de culture (*fig. 13 et 14*). La souche 5 Gly présente une inhibition moins marquée par la glycine ajoutée en faibles concentrations (jusqu'à 1 g/l) (*fig. 15*).

L'allure des courbes de croissance des trois souches est analogue à celle décrite pour B6. La croissance des bactéries A6 et A66 en milieu minimum additionné de glycine a été également suivie, la source de carbone étant le glutamate (*fig. 16 et 17*). La résistance à la glycine y est légèrement plus élevée, mais le comportement des deux souches reste le même.

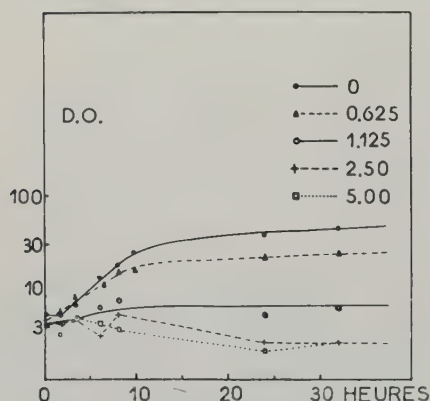


FIG. 16
(Souche A6)

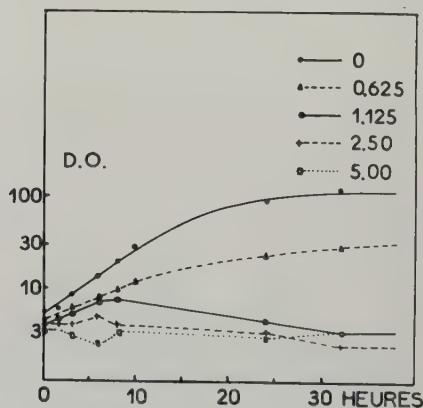


FIG. 17
(Souche A66)

FIG. 16 et 17. — Courbes de croissance des bactéries exposées à la glycine
Milieu minimum (glutamate 2 g/l) additionné de glycine (en g/l)

Nous avons cherché à classer les différentes souches selon leur degré de résistance à la glycine (*fig. 18*). Il n'est pas étonnant d'observer pour la souche 5 Gly une résistance plus élevée que celle de la souche parente, étant donné qu'elle a été sélectionnée [164] après passage sur milieux contenant de la glycine. La souche A66, isolée apparemment sans sélection, ne présente pas

de résistance accrue. Par contre, le fait que M39 soit résistant à de fortes concentrations en glycine était moins prévisible. Remarquons que le mutant M39 apparaît comme différent de

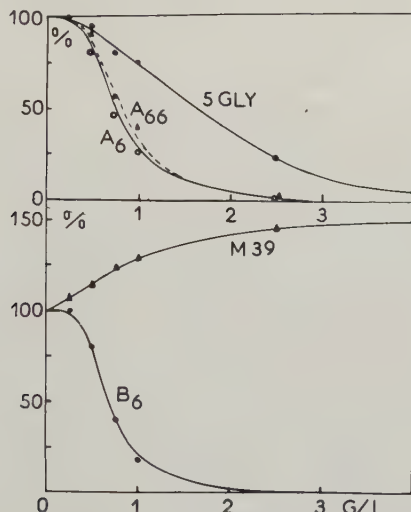


FIG. 18. — *Résistance comparée des différentes souches à la glycine*
Milieu complexe. — En ordonnée : croissance totale (en %). — En abscisse :
concentration en glycine (en g/l)

certaines formes L isolées en présence de fortes concentrations en glycine [144]. M39 examiné au microscope électronique présente une paroi apparemment normale [145].

★
★ ★

La glycine n'a aucun effet inhibiteur notable pour des concentrations inférieures à $3 \cdot 10^{-3}M$, alors que pour des concentrations voisines de $10^{-2}M$ la croissance bactérienne est fortement inhibée. Ce résultat confirme celui de BEARDSLEY [4] qui trouve un effet inhibiteur de la glycine pour des concentrations supérieures à $10^{-2}M$. Cet auteur remarque par ailleurs que les bactéries exposées à la glycine $2 \cdot 10^{-2}M$ (milieu liquide) présentent des formes anormales sphériques. De cette étude ainsi que d'une étude portant sur la résistance à d'autres acides aminés (D-méthionine, D-valine, DL-norleucine, DL-sérine), BEARDSLEY [5] conclut que les acides aminés de la série D ainsi que la glycine provoquent une inhibition de la synthèse de la paroi et de la formation des septa.

Les résultats que nous présentons ont été établis en vue de comparer la sensibilité à la glycine des bactéries étudiées et permettent de conclure que deux (M39 et 5 Gly) des trois mutants atténués étudiés présentent une sensibilité moindre que celle des souches parentes, la troisième (A66) étant aussi sensible.

5. — DISCUSSION DU CHAPITRE I

Nous avons comparé les propriétés physiologiques des bactéries des différentes souches atténuées. Les résultats montrent que les bactéries M39 se distinguent de celles de la souche parente B6 ou des autres souches atténuées A66 et 5 Gly par de nombreuses déficiences physiologiques. On ne voit pas, *a priori*, de relation entre les caractères distinctifs de M39 : la perte de pouvoir utiliser de nombreux sucres ou polyols, la non-production d'AIA à partir du tryptophane, la résistance à des concentrations élevées de glycine. Par ailleurs, les reverses de M39 sélectionnés comme se divisant activement sur glycérol comme source de carbone ne retrouvent aucune des autres propriétés étudiées des bactéries de la souche d'origine. Devant ces résultats, on peut se demander si la filiation de la souche est authentique ou s'il ne s'agit pas d'un contaminant isolé en cours de manipulation. Aussi nous rappellerons les différents arguments en faveur de l'authenticité de la souche. Nous remarquerons tout d'abord que la méthode de la sélection employée consistait à sélectionner des mutants ne se divisant pas en milieu minimum, ce qui justifie la perte de pouvoir utiliser les sucres présentés par M39. Ces bactéries sont résistantes à la streptomycine, comme la souche parente (marqueur génétique); par ailleurs, le spectre de sensibilité à différents antibiotiques est analogue à celui des bactéries de la souche parente [9], ainsi que la plupart des réactions (à l'exception de celles des sucres), permettant de caractériser les bactéries du genre *A. tumefaciens* selon BERGEY [11]. De plus, les bactéries M39 présentent une réaction croisée, à des dilutions limites très voisines, avec un sérum de lapin anti-B6 et anti-5 Gly. Enfin, les résultats de DE LEY [109], selon lesquels la composition en bases puriques et pyrimidiques des ADN des bactéries M39 serait significativement différente de celle des ADN des bactéries parentes S1 (61,9 % de guanine-cytosine pour S1, 65,6 % pour M39) semblent en désaccord avec ceux obtenus par M^{lle} SEBALD (communication à M. MANIGAULT), 57,7 % de guanine-cytosine pour S1 et 60,5 % pour M39, la différence de ces valeurs n'apparaissant pas significative.

L'ensemble de ces arguments nous permet de conclure à l'authenticité de la souche. Il se peut alors que l'ensemble des modifications présentées par M39 résulte de l'acquisition de la résistance à de fortes concentrations en glycine.

L'étude des bactéries des autres souches atténuées A66 et 5 Gly montre que celles-ci se comportent comme celles de la souche parente en ce qui concerne les propriétés étudiées. On peut donc conclure que la perte du pouvoir tumorigène n'entraîne pas nécessairement les déficiences physiologiques mises en évidence pour M39.

Les bactéries M39 étant résistantes à la glycine, on en conclut que le seul moyen (empirique) d'obtenir des bactéries atténuées reste la sélection de bactéries mutantes spontanées ou de bactéries résistantes à la glycine [163,4]. Devant l'intérêt que présente l'étude du mode d'action de cet acide aminé, nous avons entrepris une étude des propriétés physiologiques des bactéries tumorigènes exposées à la glycine. Une propriété très singulière des bactéries B6 a été mise ainsi en évidence, qui sera rapportée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

SOLUBILISATION D'UN CONSTITUANT A RENOUVELLEMENT RAPIDE DES BACTERIES B6 EXPOSEES A LA GLYCINE

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons remarqué que l'incorporation du glucose ^{14}C dans les bactéries B6 est fortement inhibée en présence de glycine 7.10^{-2}M . Lorsque la glycine est ajoutée en cours de marquage, on observe une diminution de la radioactivité déjà incorporée. Ce résultat suggérait qu'un constituant bactérien est solubilisé lorsque les bactéries B6 sont exposées à cet acide aminé. Nous avons étudié cette propriété en vue d'identifier le constituant qui se dégrade, espérant contribuer ainsi à la compréhension du mécanisme d'action de la glycine.

1° MISE EN EVIDENCE, PAR MARQUAGE AU GLUCOSE ^{14}C DE LA SOLUBILISATION D'UN CONSTITUANT DES BACTERIES B6

Les bactéries B6 sont cultivées à 30°C en milieu MS glucosé (5 g/l). La culture en croissance exponentielle est centrifugée et les bactéries sont mises en suspension dans le milieu minéral MS. Un marquage rapide est réalisé en ajoutant du glucose ^{14}C et en arrêtant le marquage 4 à 5 minutes plus tard par refroidissement à 0°C et élimination du surnageant après centrifugation ou par dilution isotopique (en ajoutant du glucose ^{12}C $1,1.10^{-2}\text{M}$). Les bactéries, remises à 30°C , sont alors exposées à la glycine 7.10^{-2}M . Des mesures de la radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à 0°C montrent que celle-ci diminue dès l'addition de la glycine pour atteindre une valeur constante en 40 minutes environ, 30 à 40 % du ^{14}C initialement incorporé sous forme acido-insoluble étant alors solubilisé (*fig. 19*).

La solubilisation produite dépend de la concentration de la glycine. La courbe représentative du phénomène a une allure sigmoïde, aucune solubilisation ne pouvant être mise en évidence pour des concentrations inférieures à 10^{-2}M (concentration minimum inhibant la croissance bactérienne) et la solubilisation maximum étant atteinte à partir de 4.10^{-2}M (*fig. 20*).

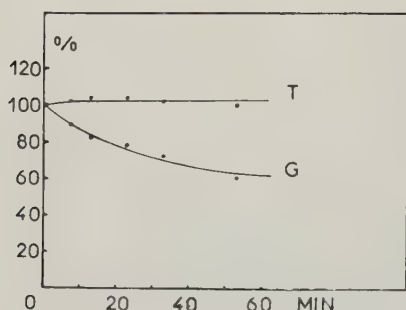


FIG. 19. — Perte, sous l'action de la glycine, de la radioactivité incorporée par les bactéries marquées rapidement au glucose ^{14}C

Durée du marquage : 4 min. — Mesure du ^{14}C incorporé sous forme acido-insoluble à 0°C — glycine 7.10^{-2}M ajoutée au début de l'expérience (0 minute). — Résultats exprimés en % de la mesure initiale. T : culture témoin. — G : même culture exposée à la glycine.

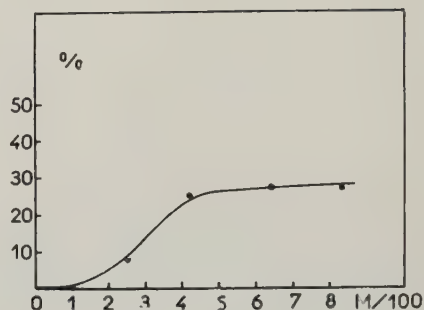


FIG. 20. — Solubilisation de la fraction marquée rapidement au glucose ^{14}C en fonction de la concentration en glycine

Durée du marquage : 4 min. — En ordonnée : % de la fraction marquée solubilisée après 60 minutes d'exposition à la glycine. — En abscisse : concentration en glycine.

La durée du marquage est importante car pour des durées supérieures à 10 minutes, la fraction de la radioactivité solubilisée diminue (fig. 21).

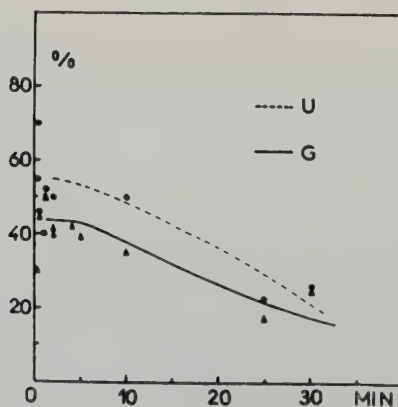


FIG. 21. — Solubilisation de la fraction rapidement marquée en fonction de la durée de marquage

En ordonnée : % de la radioactivité initialement incorporée sous forme acido-insoluble à 0°C et solubilisée après 60 minutes d'exposition à la glycine 7.10^{-2}M . — En abscisse : durée de marquage. — U : uracile ^{14}C (1 à 5 mg/l). — G : glucose ^{14}C (4.10^{-4}M).

La dégradation décrite n'est pas due à une lyse induite par la glycine car :

1° Le nombre des bactéries viables et la densité optique de la suspension bactérienne restent sensiblement constants dans les premières heures qui suivent l'addition de glycine $7 \cdot 10^{-2} M$ (fig. 22);

2° Un marquage long au glucose ^{14}C $2 \cdot 10^{-2} M$ (5 heures) ne permet pas de mettre en évidence une solubilisation dont la valeur soit supérieure aux erreurs de mesures (6 %), et un marquage long (6 heures) au $^{35}SO_4 Na_2$ confirme ce résultat (fig. 23).

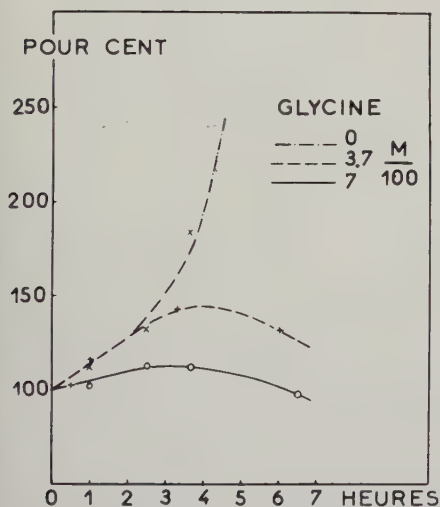


FIG. 22. — Viabilité des bactéries B6 après exposition à la glycine

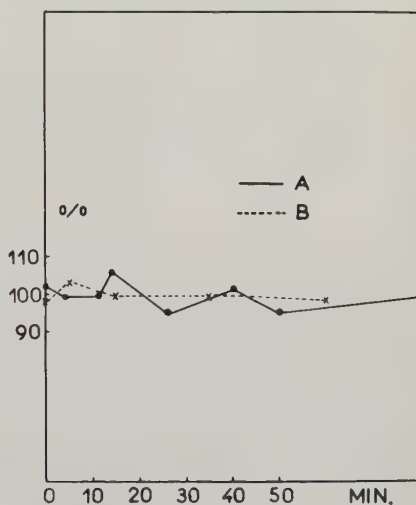
En ordonnée : nombre de bactéries viables en % du nombre initial ($2 \cdot 10^8$ bact./ml). Après exposition à la glycine les bactéries sont étalées sur gélose nutritive.

FIG. 23. — Bactéries marquées par le glucose ^{14}C (5 heures) ou le $^{35}SO_4 Na_2$ (6 heures) et exposées à la glycine $7 \cdot 10^{-2} M$

Radioactivité mesurée sous forme acido-insoluble à $0^\circ C$.

A : marqueur ^{35}S (30 $\mu g/ml$);

B : glucose ^{14}C (2 g/l).



Il est donc possible de conclure qu'une fraction bactérienne à marquage rapide est solubilisée rapidement sous l'action de la glycine.

Le fait que cette dégradation s'observe également lorsque le marquage est fait en présence de chloramphénicol (250 $\mu g/ml$) suggère que la fraction qui se solubilise n'est pas une protéine. Le constituant étudié est-il acido-soluble à chaud comme cela

serait le cas s'il s'agissait d'un acide nucléique [147] ? La radioactivité incorporée sous forme insoluble dans le TCA froid et soluble dans le TCA chaud a été mesurée en fonction de la durée d'exposition à la glycine.

Un marquage court par le glucose ^{14}C est réalisé selon le protocole déjà décrit, et les bactéries B6 sont exposées à la glycine. La radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à froid est mesurée, puis les bactéries sont portées à 95°C (dans le TCA) durant 30 minutes, et la radioactivité solubilisée est alors mesurée. La fig. 24 montre que la radioactivité initialement incorporée sous forme acido-soluble à chaud dans le TCA des bactéries exposées à la glycine diminue de 75 à 45 %, avec une cinétique comparable à celle observée pour la radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à froid. On en conclut que le constituant solubilisé sous l'action de la glycine appartient à la fraction soluble à chaud dans le TCA à 5 %, ce qui confirme qu'il n'est pas composé de protéines.

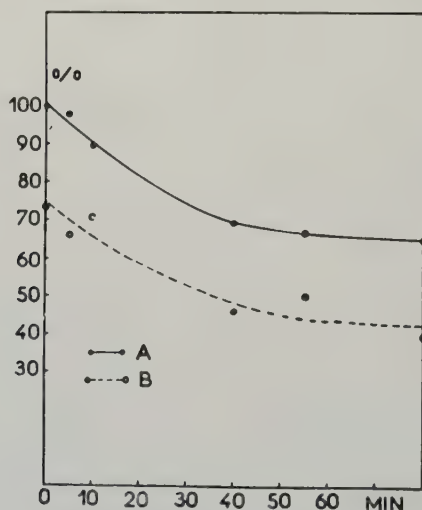


Fig. 24. — Solubilisation à chaud de la fraction marquée sous forme acido-insoluble à froid

Bactéries marquées par le glucose ^{14}C (4 min) et mises en présence de glucose et de glycine 7.10^{-2}M . — Résultats exprimés en % de la radioactivité initialement présente sous forme acido-insoluble à froid.

A : fraction acido-insoluble à froid;
B : fraction acido-insoluble à chaud.

Par ailleurs, lorsque les bactéries sont marquées uniformément au glucose ^{14}C (par un marquage long : 5 heures), 25 % seulement de la radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à froid est soluble à chaud dans le TCA. Par conséquent,

un marquage uniforme de courte durée (4 minutes) provoque préférentiellement une incorporation du ^{14}C dans la fraction soluble à chaud dans le TCA.

Le fait que la fraction qui se dégrade sous l'action de la glycine soit acido-insoluble à froid, mais acido-soluble à chaud, suggère qu'il s'agit d'un acide nucléique. Si tel était le cas, on devrait mettre en évidence une dégradation analogue lorsqu'on emploie des molécules (fournies sous forme radioactive) qui s'incorporent préférentiellement dans les acides nucléiques.

2° MARQUAGES PAR LE ^{32}P , L'URACILE ^{14}C OU L'ADENINE ^{14}C DU COMPOSANT ETUDIE

Un marquage de quelques minutes par l'un des composés suivants : phosphate ^{32}P , uracile ^{14}C ou adénine ^{14}C permet de mettre en évidence la solubilisation, provoquée par la glycine, de la fraction acido-insoluble (*fig. 25, 26, 27*). Bien que la ciné-

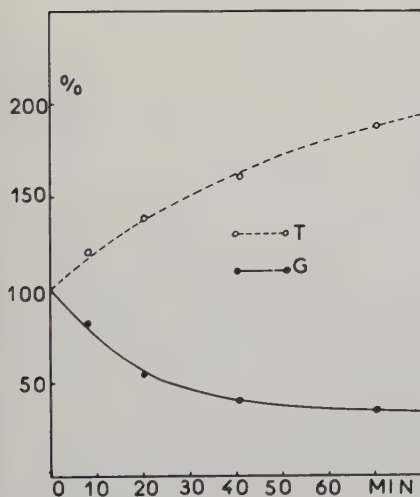


FIG. 25

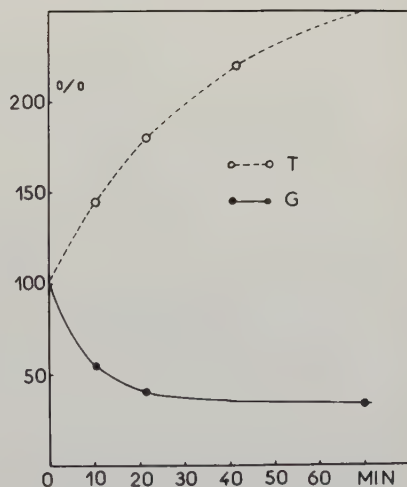


FIG. 26

FIG. 25. — Solubilisation de la fraction rapidement marquée par le $^{32}\text{P}_4\text{HNa}_2$ (20 mg/l)

Durée de marquage : 30 secondes. — Mesure du ^{14}C incorporé sous forme acido-insoluble. — T : culture témoin. — G : même culture additionnée de glycine 8.10^{-2}M .

FIG. 26. — Solubilisation de la fraction rapidement marquée par l'uracile ^{14}C (1 mg/l)

Durée de marquage : 30 secondes. — Mesure du ^{14}C incorporé sous forme acido-insoluble. — T : culture témoin. — G : même culture additionnée de glycine 8.10^{-2}M .

tique de cette dégradation ne soit pas toujours reproductible d'une expérience à l'autre, l'allure des courbes est généralement la même, la dégradation maximale étant atteinte en quarante minutes environ. Comme lors du marquage par le glucose ^{14}C , seul un marquage de durée relativement courte est efficace et on constate une solubilisation totale de l'ordre de 50 % de la fraction initialement acido-insoluble.

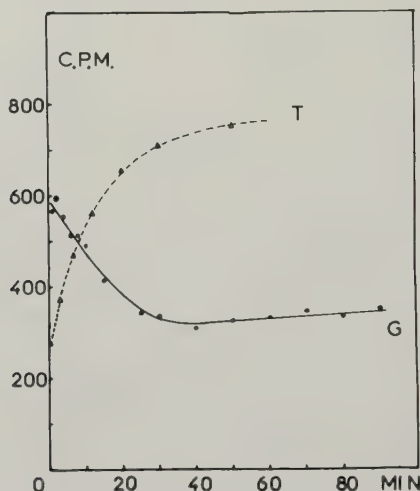


FIG. 27. — Solubilisation de la fraction rapidement marquée par l'adénine ^{14}C

Durée du marquage : 4 minutes. — Mesure du ^{14}C incorporé sous forme acido-insoluble de 1 ml de suspension bactérienne. — T : culture témoin. — G : même culture additionnée de glycine 8.10^{-2}M . — L'incorporation résiduelle (courbe T des fig. 25, 26, 27) résulte de l'incorporation de la fraction marquée sous forme acido-insoluble à froid et également de celle des substances radioactives entraînées au cours des manipulations.

Le fait que l'uracile ^{14}C s'incorpore dans la fraction qui est solubilisée suggère que celle-ci est plus précisément un acide ribonucléique. Etant donné que seul un marquage court est efficace, il s'agirait d'un ARN à renouvellement rapide. Les arguments que nous avons apportés en faveur de cette hypothèse sont cependant indirects. On pourrait imaginer que la fraction dégradée soit un « transporteur » nucléoside-diphosphate mucopeptide impliqué dans les réactions du type transglycosilations telles qu'on les observe au cours de la biosynthèse de la paroi [132, 103, 157]. Le fait que l'adénine ^{14}C constitue un marqueur aussi efficace que l'uracile ^{14}C pour mettre en évidence une telle dégradation n'est pas en faveur de l'hypothèse précédente puisque, à notre connaissance, aucun dérivé phosphorylé de l'adénine n'est impli-

qué dans la synthèse de la paroi. Nous avons néanmoins cherché à caractériser chimiquement la fraction qui se dégrade en procédant à l'extraction des ARN.

3° EVALUATION DES RADIOACTIVITES SPECIFIQUES DES ARN EXTRAITS DES BACTERIES EXPOSEES OU NON A LA GLYCINE

Les bactéries marquées par l'uracile ^{14}C sont centrifugées, puis la récolte est divisée en deux. La première partie est traitée de suite selon la méthode au phénol. Les bactéries de la seconde sont suspendues en milieu MS glucosé et sont exposées 40 minutes à la glycine 7.10^{-2}M , puis les ARN sont extraits de la même façon. On évalue les radioactivités spécifiques des ARN extraits de bactéries traitées ou non par la glycine. Le tableau (14) montre une diminution de cette radioactivité spécifique consécutive à l'exposition des bactéries à la glycine.

TABLEAU 14
Radioactivité spécifique des ARN

AVANT EXPOSITION A LA GLYCINE	APRES EXPOSITION A LA GLYCINE
6.900*	1.940*
100 %	28 %

* Radioactivité spécifique évaluée en coups par minute par mg d'ARN. L'ARN est dosé par son absorption U.-V. après précipitation dans l'acide perchlorique 0,3M à 0° C et dissolution dans l'eau distillée.

La centrifugation différentielle en gradient de saccharose des ARN extraits montre que (*fig. 28*) :

1° La fraction à marquage rapide sédimente de façon différente de celle des autres ARN (ribosomique ou de transfert), décelables par leur absorption dans l'U.V.;

2° La radioactivité spécifique des ARN extraits de bactéries exposées à la glycine a diminué, et cela pour l'ensemble des fractions séparées par centrifugation.

Nous avons vérifié que la radioactivité spécifique des ARN extraits des bactéries marquées dans les mêmes conditions mais incubées ultérieurement sans glycine se répartit après la centrifugation comme les ARN décelables par leur absorption U.V. et que la radioactivité spécifique ne diminue pas.

On peut donc conclure qu'à la suite d'un marquage rapide des bactéries par l'uracile ^{14}C :

1° Une partie du marqueur est incorporée dans une fraction des acides ribonucléiques qui sédimente en gradient de saccharose de façon différente de celle des autres ARN;

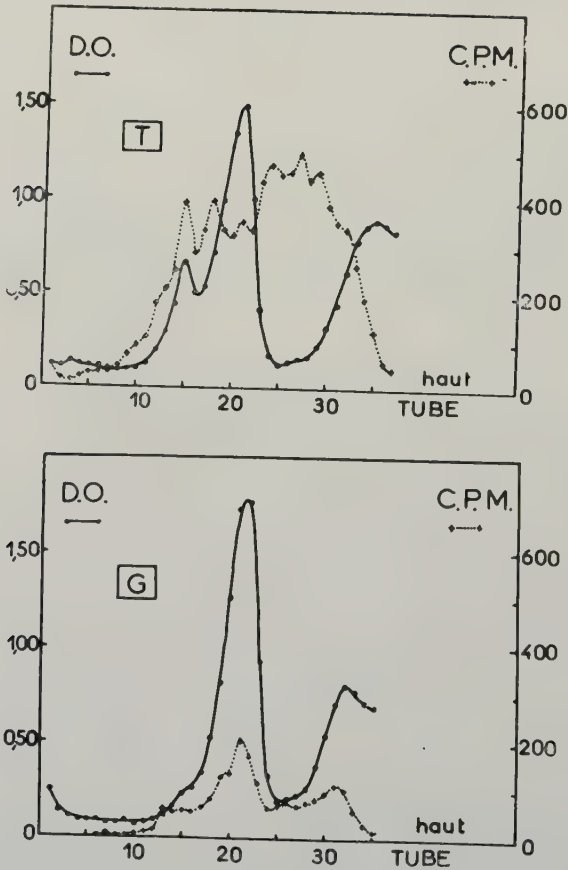


FIG. 28. — Centrifugation différentielle en gradient de saccharose des ARN extraits des bactéries

Marquage à l'uracile ^{14}C (1 mg/l) = 4 min. — D.O. : densité optique à 260 $\text{m}\mu$. — C.P.M. : radioactivité (sous forme acido-insoluble) par tube exprimé en nombre d'impulsions par minute. — T : bactéries non exposées à la glycine. — G : bactéries exposées à la glycine.

2° Une fraction considérable des ARN qui se marquent rapidement est solubilisée, mais les produits de cette dégradation ne sont plus réincorporés dans les ARN ribosomiques et de transfert

lorsque les bactéries sont exposées à la glycine. On constate effectivement une inhibition de 95 % de la synthèse des ARN, mesurée par l'incorporation de l'uracile ^{14}C (fig. 29).

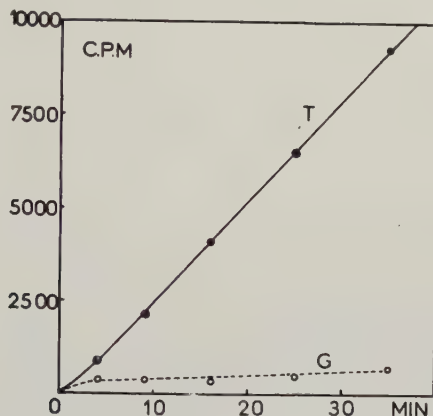


FIG. 29. — Incorporation de l'uracile ^{14}C dans les bactéries B6 exposées à la glycine

Bactéries cultivées en milieu MS glucosé (5 g/l). — Uracile ^{14}C (0,5 mg/l) ajouté en même temps que la glycine $3,3 \cdot 10^{-2}\text{M}$ (courbe G). — Courbe T : bactéries témoins.

On sait que la fraction des ARN à marquage rapide comprend principalement les ARN « messagers » (ARNm) dont il a été montré qu'ils sont particulièrement instables (FAN *et al.* [52], SOFFER et GROS [151], LEVINTHAL *et al.* [108], KEPES [91]. Nos résultats suggèrent que la fraction dont la solubilisation est rendue apparente par l'action de la glycine est constituée, au moins en partie, par les ARNm. Pour démontrer que tel est bien le cas il faudrait, en toute rigueur, prouver que la composition en bases puriques et pyrimidiques est celle de l'ADN et que cet ARN à marquage rapide constitue une matrice pour la synthèse des protéines. A défaut de ces démonstrations que nous n'avons pas abordées, nous aurions déjà une confirmation de l'hypothèse avancée en utilisant l'actinomycine D, dont on sait qu'elle inhibe spécifiquement la transcription de l'ADN en ARN, pour caractériser la fraction des ARN solubilisés après l'action de la glycine : bien que l'actinomycine D inhibe fortement, *in vitro*, l'ADN-ARN transcriptase (HOCHSTER et CHANG [75] isolée de *A. tumefaciens*, l'antibiotique est sans action notable sur l'incorporation de l'uracile ^{14}C par les bactéries, probablement parce qu'il ne pénètre pas dans les cellules.

Ne pouvant utiliser l'actinomycine D pour identifier la fraction étudiée à l'ARNm, nous avons dû recourir à l'analyse cinétique pour essayer de répondre à deux questions :

1° Est-ce que la vitesse de marquage de la fraction étudiée est du même ordre de grandeur que celle des ARNm des autres espèces bactériennes ?

2° Est-ce que la solubilisation observée résulte du renouvellement rapide des ARNm ou bien est-elle induite par la glycine, en se produisant à une vitesse différente ? Pour cela, nous avons comparé la vitesse de marquage déterminée en absence de glycine à la vitesse de solubilisation de la fraction étudiée en présence de glycine.

4° VITESSE DE MARQUAGE DE LA FRACTION ETUDIEE

La demi-vie de marquage est définie comme étant le temps nécessaire pour marquer 50 % des molécules de la fraction qui se solubilise après exposition des bactéries à la glycine.

Les bactéries, cultivées en milieu minimum glucosé sont marquées pendant des temps variables par l'uracile ^{14}C . La glycine est ajoutée à la concentration finale 8.10^{-2}M , à divers instants après l'addition de l'uracile ^{14}C . La radioactivité insoluble dans le TCA est mesurée immédiatement après l'addition de la glycine (fig. 30A, courbe T), ainsi que 50 minutes plus tard (fig. 30A, courbe G), la différence représentant la fraction solubilisée dans le TCA sous l'action de la glycine. La courbe représentative du marquage de la fraction étudiée montre l'existence de deux phases d'incorporation :

1° Une phase d'incorporation rapide, dont la demi-vie est de 6 minutes (fig. 30 B et C);

2° Une phase ultérieure d'incorporation plus lente (approximativement 6 fois moins rapide) (fig. 31). On n'obtient pas, comme on pouvait s'y attendre, un taux d'incorporation constant. Ce fait pourrait résulter de ce que pour les durées de marquage longues, la radioactivité incorporée l'est aussi sous forme de cytosine ^{14}C (comme le montre la chromatographie d'un hydrolysat alcalin des bactéries marquées). Il ne peut être cependant exclu qu'une fraction à marquage nettement plus lent soit également dégradée.

La valeur trouvée de la demi-vie de renouvellement est égale au $1/30^{\circ}$ du temps de doublement à 30°C . Cette valeur est en bon accord avec l'hypothèse que la fraction qui est solubilisée est constituée essentiellement par les ARNm. En effet, LEVINTHAL *et all.* [108], mesurant la vitesse de solubilisation dans le TCA froid de la fraction rapidement marquée des ARN de *Bacillus subtilis* exposé à l'actinomycine D, évaluent la demi-vie des ARNm au $1/35^{\circ}$ du temps de doublement. KEPES [91] a déterminé, de façon très spécifique, la demi-vie de l'ARNm constituant la matrice pour la synthèse de la β -galactosidase d'*Escherichia coli*, et trouve une valeur correspondant au $1/70^{\circ}$ du temps de doublement.

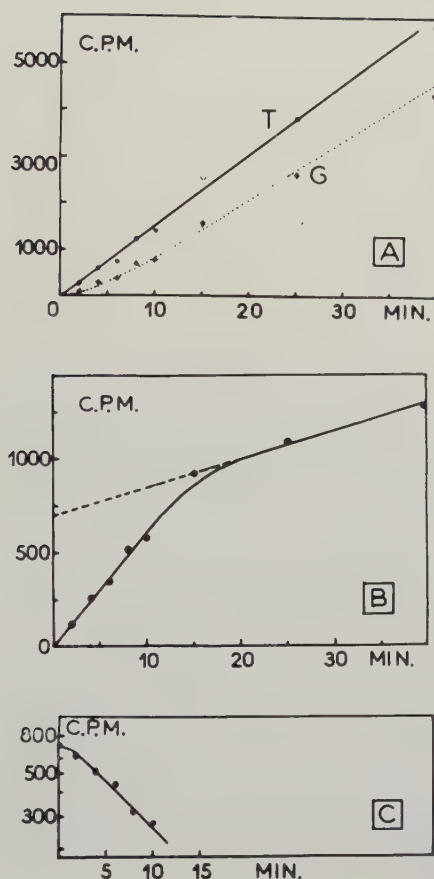


FIG. 30. — Détermination de la demi-vie de marquage de la fraction solubilisée sous l'influence de la glycine

FIG. A. — Incorporation de l'uracile ^{14}C dans la fraction acido-insoluble à 0°C en fonction de la durée de marquage (courbe T) et incorporation résiduelle après exposition ultérieure des bactéries à la glycine (8.10^{-2}M , 50 min.) (courbe G).

FIG. B. — Incorporation, en fonction du temps de marquage, de l'uracile ^{14}C dans la fraction solubilisée après action de la glycine (différence des mesures représentées courbe T et courbe G).

FIG. C. — Représentation semi-logarithmique de la courbe complémentaire de celle représentée fig. 23 B. — Uracile ^{14}C : 1 mg/l; les incorporations mesurées ont été corrigées pour la croissance qui se produit avant l'addition de glycine.

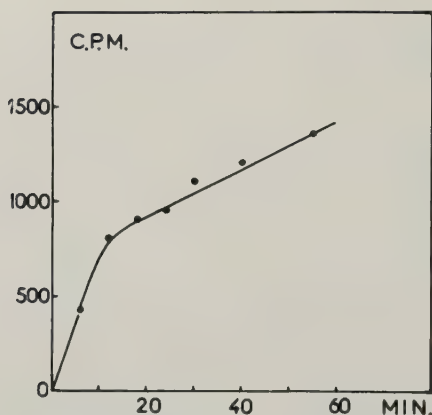


FIG. 34. — Incorporation, en fonction du temps de marquage, de l'uracile ^{14}C , dans la fraction solubilisée sous l'influence de la glycine
(Expérience analogue à celle décrite pour fig. 34 B.)

5° VITESSE DE SOLUBILISATION DE LA FRACTION ETUDIEE

Les bactéries préalablement marquées un temps court à l'uracile ^{14}C puis exposées à la glycine solubilisent la fraction étudiée selon une cinétique qui semble être du premier ordre en fonction du temps. Les temps de demi-vie mesurés d'une expérience à l'autre

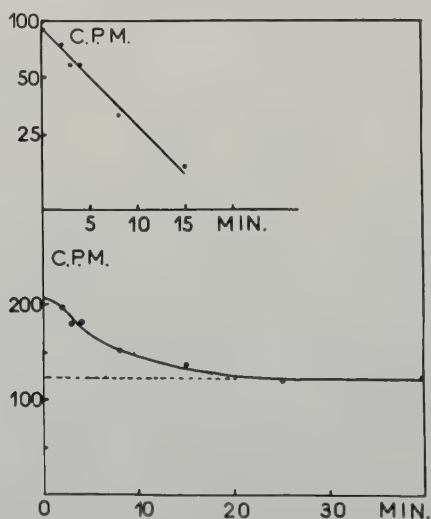


FIG. 32. — Solubilisation en présence de glycine de la fraction acido-insoluble marquée rapidement

Représentation semi-logarithmique (uracile ^{14}C , 0,66 mg/l. — Durée de marquage : 4 min. — Glycine : $8 \cdot 10^{-2}\text{M}$).

n'ont pas des valeurs absolument reproductibles, mais sont voisins de 6 minutes (*fig. 32*). Nous remarquerons que la demi-vie de solubilisation (en présence de glycine) est du même ordre de grandeur que la demi-vie de marquage (mesurée en absence de glycine). Nous concluons donc que la glycine ne modifie pas la vitesse de dégradation normale des ARNm, mais démasque leur solubilisation en empêchant la réincorporation des produits dégradés.

6° ACTION DE LA GLYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES PROTEINES

Si en présence de glycine les bactéries ne synthétisent plus les ARNm, on doit observer un arrêt de la synthèse des protéines. Par ailleurs, on peut penser que des bactéries exposées préalablement à la glycine, puis celle-ci étant éliminée, ne synthétiseront des protéines que dans la mesure où les ARNm seront synthétisés *de novo*. Aussi avons-nous mesuré l'incorporation du tryptophane ^{14}C sous forme acido-insoluble dans les bactéries exposées à la glycine, ou en l'absence de cette dernière, en utilisant alors des bactéries préalablement exposées à la glycine.

a) INCORPORATION DU TRYPTOPHANE ^{14}C DANS LES BACTÉRIES EXPOSÉES À LA GLYCINE

Lorsque le tryptophane ^{14}C et la glycine sont ajoutés en même temps au milieu de culture, un arrêt brusque de l'incorporation se produit une minute plus tard (*fig. 33*). Est-il provoqué par une action inhibitrice de la glycine sur la pénétration du

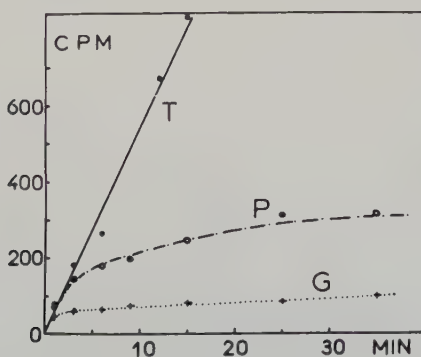


FIG. 33. — Action de la glycine et de la proflavine sur l'incorporation du tryptophane ^{14}C

Le tryptophane et la glycine (G) ou la proflavine (P) sont ajoutés simultanément à 0 min. La radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à froid est mesurée à temps variable. — (T : culture témoin.) — Tryptophane ^{14}C : 7,8 mg/l). — Glycine : $8 \cdot 10^{-2}\text{M}$. — Proflavine : 14 mg/l.

tryptophane radioactif dans les cellules bactériennes ? Pour répondre à cette question, la vitesse de pénétration du tryptophane ^{14}C (6 mg/l) dans des bactéries préalablement exposées 1 à 5 minutes à la glycine a été mesurée (en présence de ce dernier acide aminé). On constate que la vitesse de pénétration est réduite respectivement de 28 et 63 %. Par contre, l'incorporation du tryptophane ^{14}C sous forme acido-insoluble est inhibée, nous l'avons vu, à 98 % dès les premières minutes qui suivent l'exposition des bactéries à la glycine. Les deux cinétiques sont donc très différentes, et l'arrêt de l'incorporation se produit bien avant que la réduction de la vitesse de pénétration du tryptophane ^{14}C ne devienne notable. On peut donc conclure que l'arrêt de l'incorporation résulte très probablement d'une inhibition très marquée des synthèses protéiques. Cet arrêt est-il provoqué par une quantité limitante des ARNm ? La vitesse de solubilisation que nous avons déjà mesurée ne permet pas de le penser (la demi-vie est de l'ordre de 6 minutes alors que l'incorporation du tryptophane ^{14}C s'arrête en une minute). Un autre argument conduisant à la même conclusion peut être tiré de l'étude de l'action de la proflavine. Ce colorant, qui inhibe la transcription de l'ADN en ARN [80], démasque la solubilisation des ARNm chez *Escherichia coli* [151] et chez *A. tumefaciens* (fig. 34). Ajouté en même temps que le tryptophane ^{14}C , il laisse subsister une incorporation nettement plus forte que la glycine, alors que l'arrêt de la synthèse des ARN se produit en moins d'une minute. Les ARNm présents peuvent donc « dicter » plus

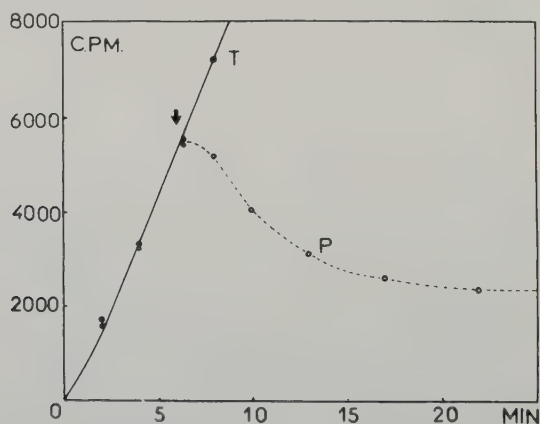


FIG. 34. — Solubilisation en présence de proflavine de la fraction acido-insoluble marquée rapidement par l'uracile ^{14}C (1 mg/l)

Bactéries B6 cultivées en milieu MS glucosé (5 g/l). — Uracile ^{14}C (1 mg/l) rajouté à 0 min. — 6 minutes après (flèche), la proflavine (14 mg/l) est ajoutée (courbe G). — Courbe T : bactéries témoin. — La radioactivité incorporée sous forme acido-insoluble à froid est mesurée sur un ml de culture.

de protéines que les bactéries exposées à la glycine n'en synthétisent. On peut donc conclure que la glycine provoque un arrêt de la synthèse protéique bien avant que la quantité des ARNm soit limitante.

b) INCORPORATION DU TRYPTOPHANE ^{14}C , EN L'ABSENCE DE LA GLYCINE DANS LES BACTÉRIES EXPOSÉES AU PRÉALABLE A LA GLYCINE

L'arrêt de l'incorporation est-il réversible en enlevant la glycine? Si tel était le cas, on devrait s'attendre à voir la synthèse protéique limitée, la glycine étant enlevée, par la quantité des ARNm résiduels. Une culture de bactéries B6 est exposée à la glycine 8.10^{-2}M durant 50 minutes, puis est diluée 10 fois (pour éliminer l'action inhibitrice de la glycine) dans du milieu contenant du tryptophane radioactif. L'incorporation du tryptophane ^{14}C sous forme acido-insoluble est suivie en fonction du temps. La fig. 35 montre que le prétraitement par la glycine

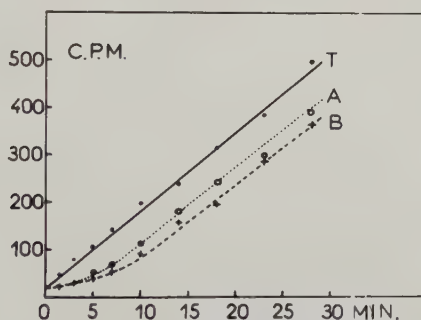


FIG. 35. — Incorporation du tryptophane ^{14}C (2 mg/l) par les bactéries préalablement exposées à la glycine 8.10^{-2}M

Culture diluée 10 fois au début de l'expérience.

T : Bactéries témoins exposées à la glycine 8.10^{-3}M à l'instant initial.

A : Bactéries préalablement exposées 13 minutes à la glycine 8.10^{-2}M .

B : Bactéries préalablement exposées 50 minutes à la glycine 8.10^{-2}M .

provoque un retard de l'incorporation. Pour un prétraitement de 13 minutes, ce retard est de 4,5 minutes, et pour un prétraitement de 50 minutes, le retard est de 6 minutes, après quoi l'incorporation reprend à son taux normal. Cette durée est celle, que l'on peut prévoir *a priori*, de la demi-vie de synthèse des ARNm. Par conséquent, la synthèse protéique apparaît comme étant limitée par la quantité des ARNm résiduels après exposition des bactéries à la glycine.

En conclusion, l'étude de l'incorporation du tryptophane ^{14}C montre que la glycine a deux actions sur les bactéries B6 : elle provoque un arrêt des synthèses des ARNm, elle inhibe la synthèse protéique avant que les ARNm ne soient en quantité limitante.

7° SPECIFICITE ET GENERALITE DE L'ACTION DE LA GLYCINE

Nous venons de voir que la glycine provoque, chez les bactéries B6, une inhibition simultanée des synthèses ARN et des synthèses protéiques. Nous envisagerons maintenant deux questions :

- Cette action est-elle propre à la glycine, ou est-elle partagée par tous les autres acides aminés inhibiteurs de la croissance ?
- Cette sensibilité à la glycine est-elle propre aux bactéries de la souche B6, ou aux souches qui, comme B6, sont tumorigènes ?

TABEAU 15

Action des acides aminés inhibiteurs de la croissance sur la fraction marquée rapidement par l'uracile ^{14}C

ACIDE AMINE	CONCENTRATION ATTÉNUATRICE (10 ⁻² M) (a)	CONCENTRATION UTILISÉE (10 ⁻² M)	RADIO- ACTIVITE RETENUE après 70 mn de traitement
Glycine	2,0	8,0	58 %
Diglycine	5,0	7,1	178 %
D méthionine	0,5 (b)	2,1	210 %
D valine	0,5 (b)	2,1	179 %
D sérine	—	2,1	172 %
DL méthionine ...	1,33	8,0	97 %
DL valine	1,33	7,1	154 %
DL sérine	5,0	8,0	95 %
L thréonine	—	8,0	103 %
L leucine	3,33	4,7	101 %
L lysine	2,5	7,1	159 %

Les bactéries B6 sont marquées 5 minutes par l'uracile ^{14}C , puis centrifugées et mises en suspension en milieu minimum contenant l'un des acides aminés à la concentration finale indiquée. Le ^{14}C présent sous forme acido-insoluble est mesuré immédiatement et après une exposition de 70 minutes des bactéries à l'acide aminé. La radioactivité retenue est exprimée en % de la radioactivité initialement présente. L'incorporation résiduelle (chiffres supérieurs à 100 %) résulte de l'incorporation de la fraction marquée sous forme acido-soluble à froid, et également de celle de l'uracile ^{14}C entraîné au cours des manipulations. Les différences dans les valeurs supérieures à 100 % ne sont pas significatives.

(a) = Concentration requise pour sélectionner des souches atténuées selon VAN LANEN *et al.* [153].

(b) = Concentration requise pour sélectionner des souches atténuées selon BEARDSLEY [4].

Ces concentrations sont inhibitrices de la croissance bactérienne.

a) ETUDE DE L'ACTION DES AUTRES ACIDES AMINÉS
INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DE B6

Les résultats de cette étude montrent que sur les onze acides aminés inhibiteurs de la croissance essayés, seule la glycine est capable de provoquer le phénomène décrit (*tabl. 15*). Bien que tous les acides aminés essayés permettent d'obtenir des mutants atténués [5, 164], seule la glycine provoque, de façon apparente, la solubilisation des ARNm.

b) ACTION DE LA GLYCINE SUR LES DIVERSES SOUCHES ÉTUDIÉES

Après un marquage court par l'uracile ^{14}C , les bactéries des différentes souches utilisées ont été exposées à la glycine, et la solubilisation de la fraction rapidement marquée a été mesurée. L'examen des résultats (*fig. 36*) montre que la glycine, qui pro-

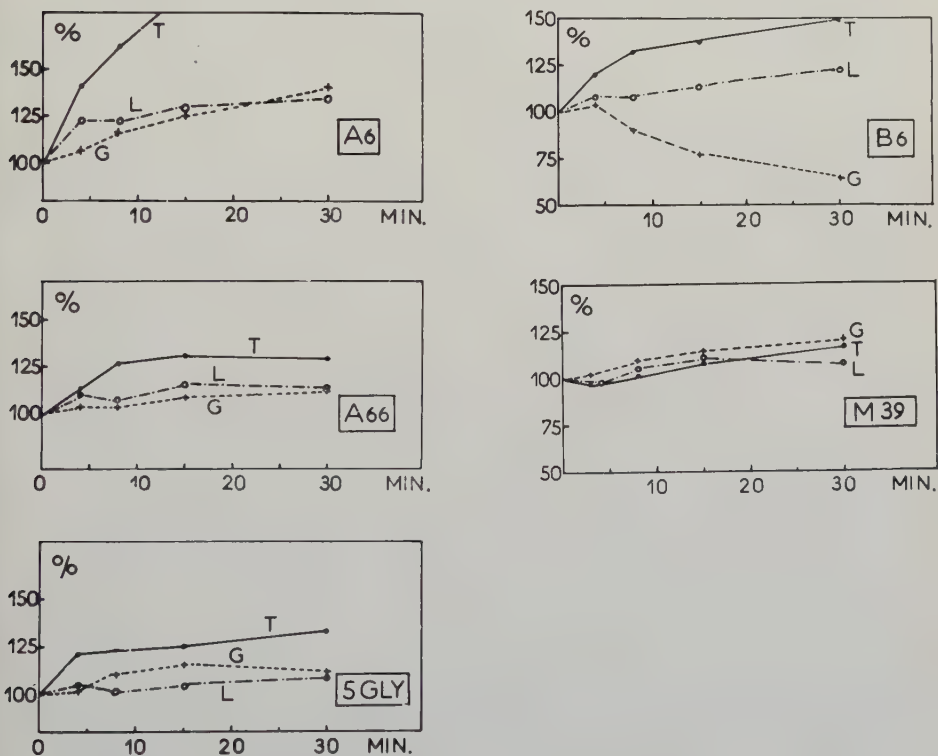


FIG. 36. — Action de la glycine sur la fraction à marquage rapide des différentes souches étudiées

T : culture témoin.

G : culture additionnée de glycine 8.10^{-2}M .

L : culture additionnée de lysine 8.10^{-2}M .

voque la solubilisation apparente des ARNm des bactéries B6, n'a pas d'effet décelable sur ceux des autres souches. En particulier, les bactéries A6 étant, en ce qui concerne cette propriété, insensibles à la glycine, la sensibilité de B6 ne peut être reliée à son caractère tumorigène. L'insensibilité du mutant M39, dérivé de B6, ne saurait surprendre puisque les bactéries de cette souche se divisent activement en présence de glycine $7.10^{-2}M$. Les mutants atténués A66 et 5 Gly se comportent comme la souche parente tumorigène A6.

8° DISCUSSION

Les observations présentées nous ont fait conclure que l'action de la glycine sur les bactéries B6 comporte une inhibition de la synthèse des ARN qui démasque la solubilisation spontanée des ARNm. On sait que, d'une façon générale, les inhibiteurs de l'ADN-ARN transcriptase : l'actinomycine D [80], le dinitrophénol et la proflavine [151, 80] provoquent un démasquage analogue. On doit donc se demander si la glycine, à certaines concentrations, n'inhiberait pas de façon spécifique, l'ARN polymérase transcrivant l'ADN en ARN. Si tel était le cas, on devrait s'attendre à des modifications physiologiques initiales limitées à la biosynthèse des ARN. Or, on constate d'une part que la synthèse protéique s'arrête avant que les ARNm ne soient en quantité limitante, et d'autre part que la glycine exerce un effet inhibiteur sur la pénétration du tryptophane ^{14}C . De plus, nous avons récemment constaté, sous l'influence de la glycine, une inhibition très marquée de la synthèse d'ADN (mesurée par l'incorporation du ^{32}P dans la fraction résistant à l'hydrolyse alcaline). La glycine n'agit donc pas spécifiquement sur la transcription de l'ADN en ARN, mais simultanément sur les synthèses de protéines, d'ARN et d'ADN. Il est tentant d'attribuer à une cause unique, dite « effet primaire » de la glycine, des manifestations biochimiques aussi diverses. Cet effet primaire doit être réversible puisque, lorsqu'on enlève la glycine, la synthèse protéique reprend à vitesse normale dès que les ARNm ne sont plus limitants. Nous envisagerons plus particulièrement deux hypothèses sur la nature de cet effet primaire :

1° Un arrêt simultané de la plupart des synthèses macromoléculaires a été décrit chez *Echerichia coli* exposé à la colicine K (NOMURA et NAKAMURA) [130] et E1 (NOMURA) [129]. Le phénomène est réversible comme le montre l'action de la tryptosine [130]. Pour expliquer ces observations, dont l'analogie avec la situation ici décrite est frappante, LEVINTHAL et LEVINTHAL (cité par NOMURA [129]) ont invoqué une action biochimique primaire de la colicine E, qui consisterait à provoquer un arrêt des phosphorylations oxydatives. Il convenait donc d'envisager qu'un tel

mécanisme puisse également être à la base de l'action de la glycine sur les bactéries B6. C'est pourquoi nous avons chromatographié la fraction acido-soluble (marquée au ^{32}P) des bactéries B6 exposées à la glycine. Ce faisant, nous avons pu y déceler la présence d'adénosine triphosphate, ce qui ne nous semble pas être compatible avec l'hypothèse envisagée. On sait d'ailleurs que les colicines agissent en un point spécifique de la membrane bactérienne, et il est difficile d'imaginer une spécificité analogue pour une molécule aussi simple que celle de la glycine. Aussi rechercherons-nous une autre hypothèse pour expliquer le mode d'action de la glycine ;

2° On sait que les acides aminés jouent un rôle important dans la régulation de la synthèse des ARN (GROS et GROS [70], ARONSON et SPIEGELMAN [1]). D'une façon générale, on constate un arrêt des synthèses des ARN lorsque les bactéries sont carencées en un acide aminé. Cette régulation constituerait le moyen essentiel qu'a la cellule de contrôler l'ensemble des synthèses d'ARN et d'ajuster ainsi le nombre de ribosomes qu'elle contient aux synthèses protéiques possibles. KURLAND et MALOE [101] et STENT et BRENNER [153] ont proposé que cette régulation dite « stringente » s'effectue par l'intermédiaire de la charge ou de la décharge des ARN de transfert. L'existence de cette régulation pourrait-elle expliquer les effets décrits de la glycine sur les bactéries B6 ? Nous avons vérifié que les bactéries B6 présentent la régulation stringente : les bactéries B6 met⁻, carencées en méthionine, n'incorporent plus l'uracile ^{14}C qu'à une vitesse très réduite (86 % d'inhibition). Il se pourrait que l'effet primaire de la glycine en fortes concentrations soit, en lésant la membrane cytoplasmique, de provoquer l'expulsion de certains acides aminés du « pool » de la bactérie. Un état de carence en acides aminés serait ainsi produit qui, par l'intermédiaire de la régulation stringente, provoquerait un arrêt des synthèses d'ARN. En accord avec les résultats décrits, cette hypothèse semble pouvoir également rendre compte d'effets aussi divers provoqués par la glycine que l'inhibition de la synthèse d'ADN et de celle de la vitesse de pénétration du tryptophane ^{14}C dans les bactéries. Ce modèle conduit à prévoir que l'addition d'acides aminés au milieu de culture doit supprimer les effets décrits. Des expériences préliminaires indiquent que tel est bien le cas : lorsque les bactéries B6, marquées rapidement à l'uracile ^{14}C sont exposées à la glycine en présence d'un hydrolysate de caséine (2 %), la solubilisation des ARNm ne peut plus être mise en évidence. De plus la synthèse des ARN reprend à une vitesse voisine de la normale. Ces résultats, en accord avec le modèle proposé, suggèrent que l'effet primaire de la glycine pourrait être de provoquer une

modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à certains acides aminés.

L'hypothèse de BEARDSLEY [4] selon laquelle la glycine provoquerait une inhibition de la synthèse de la paroi paraît être en accord avec celle que nous proposons. On peut penser en effet que certaines lésions de la membrane puissent provoquer l'arrêt des biosynthèses de la paroi.

Une autre hypothèse serait que la glycine provoque une inhibition de la synthèse d'un ou de plusieurs acides aminés, le mécanisme étant celui de la rétro-inhibition de l'activité enzymatique [131, 140, 161, 173]. Une carence en certains acides aminés serait ainsi créée, la régulation stringente provoquant alors un arrêt des synthèses d'ARN. Si tel était le cas, on devrait constater que le mécanisme de pénétration de ces acides aminés n'est pas lésé lorsque les bactéries sont exposées à la glycine. Il semble que la détermination du ou des acides aminés absents dans le « pool » des bactéries exposées à la glycine puisse permettre de préciser le mode d'action de la glycine.

Ces hypothèses soulèvent cependant un problème. Nous avons vu que la glycine inhibe également la croissance des deux souches tumorigènes étudiées (B6 et A6). Cependant, l'effet de la glycine ne peut être mis en évidence que pour les bactéries de la souche B6. Faut-il en conclure que le mode d'action de la glycine varie avec la souche employée, bien que l'inhibition de la croissance se produise aux mêmes concentrations pour les deux souches ? Il semble plus raisonnable d'admettre que le mécanisme d'action de la glycine est unique, mais que les effets de la lésion « primaire » puissent être différents selon la souche employée. Le fait que la glycine inhibe à 80 %, chez les bactéries A6, la synthèse des ARN (mesurée par l'incorporation de l'uracile ^{14}C) sans provoquer d'inhibition aussi marquée des synthèses protéiques (mesurées par l'incorporation du tryptophane ^{14}C) semble justifier cette remarque. En ce qui concerne B6, le fait que la D-méthionine, la DL-valine, et la DL-norleucine aient des effets additifs à ceux de la glycine quant à l'inhibition de la croissance (BEARDSLEY) [5], bien que ne produisant pas les effets décrits, doit nous rendre particulièrement prudents en ce qui concerne ces conjectures. Quoi qu'il en soit, il nous semble que les effets de la glycine, que nous avons mis en évidence, puissent permettre de préciser le mode d'action de cet acide aminé sur les bactéries tumorigènes.

RESUME

Nous nous sommes attachés à l'étude du problème de l'induction des tumeurs dites du « crown-gall » par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWN.) CONN, en établissant la relation qui existe entre poids des tumeurs et nombre de bactéries inoculées. On obtient, dans un certain domaine, une fonction croissante, mais qui n'exprime cependant pas une relation de proportionnalité : le poids des tumeurs augmente moins vite que le nombre de bactéries inoculées. Nous avons montré que la taille réduite des tumeurs résulte d'une limitation dans le nombre de cellules induites, la vitesse de croissance des tumeurs étant apparemment la même quelle que soit leur taille.

Nous avons envisagé plusieurs hypothèses pour expliquer les résultats obtenus. Compte tenu de la mobilité des bactéries *in situ*, le poids des tumeurs obtenues est alors celui que l'on attendait si le nombre de bactéries efficaces était égal au nombre moyen de bactéries présentes. La bactérie apparaît remarquablement efficace puisqu'une seule bactérie devrait suffire à transformer une cellule végétale.

Ces résultats nous ont incité à étudier le poids des tumeurs obtenues par inoculation d'un mutant auxotrophe (exigeant l'isoleucine et la valine) de la souche tumorigène. Cette bactérie, carencée *in situ* (mais ne se lysant pas), n'induit que des tumeurs de taille réduite, ce qui suggère que le principe inducteur de tumeur (P.I.T.) est synthétisé préférentiellement par les bactéries *in situ*.

Nous avons abordé le problème de façon différente en étudiant les propriétés phytopathogènes des bactéries des souches atténuées isolées depuis longtemps (A66 et 5 Gly isolés de A6) ou plus récemment (M39 de B6). On peut classer ces souches en deux groupes :

1° Les bactéries A66 qui provoquent la formation de tumeurs à croissance plus lente que celles induites par la souche parente, mais dont la vitesse de croissance peut être amenée à celle des tumeurs provoquées par la souche parente au moyen d'un apport (constant) de phytohormones au point d'inoculation.

2° Les bactéries M39 et 5 Gly, qui provoquent la formation d'une hyperplasie qui se nécrose en quelques semaines. L'apport de phytohormones, effectué par trois techniques différentes, ne produit aucun effet décelable, ce qui suggère que ces excroissances ne sont pas des tumeurs.

Il existe donc au moins deux catégories de mutations bactériennes provoquant, l'une la perte, apparemment totale, l'autre la modification du pouvoir tumorigène des bactéries parentales.

L'un des mutants (M39) ayant été isolé parce qu'il ne se divisait pas en milieu minimum, on pouvait espérer mettre en évidence des différences dans la physiologie des souches bactériennes en corrélation avec la perte ou l'atténuation du pouvoir tumorigène.

L'étude comparée des trois souches atténuées montre que les bactéries M39 se distinguent de celles de la souche parente et de celles des autres souches atténuées par :

1° La perte de pouvoir utiliser de nombreux sucres ou polyols, ce qui apparaît comme la cause de la non-production de 3-céto-lactose à partir du lactose.

2° L'absence de production d'AIA à partir du tryptophane au cours de la croissance bactérienne. Lorsque les bactéries ne sont pas préalablement exposées au tryptophane, une production d'AIA peut être cependant mise en évidence (en présence de chloramphénicol).

3° La croissance en présence de fortes concentrations de glycine ($7.10^{-2}M$). 5 Gly sélectionné comme résistant à la glycine a conservé une résistance à de plus faibles concentrations ($2.10^{-2}M$) et A66 apparaît comme aussi sensible que la souche parente A6 ($10^{-2}M$).

Les bactéries M39 présentent donc de nombreuses modifications physiologiques. Il est possible qu'elles résultent de l'acquisition de la résistance à de fortes concentrations en glycine. Par ailleurs le fait que la sélection de mutants résistants à la glycine permette d'isoler des bactéries atténuées suggère que la perte du pouvoir tumorigène est également une conséquence de l'acquisition par M39 de la résistance à la glycine.

Les résultats présentés concernant les trois souches atténuées montrent qu'il n'existe pas de corrélation évidente entre les propriétés physiologiques étudiées et l'atténuation ou la perte du pouvoir tumorigène. Le fait que les mutants atténués aient été nécessairement obtenus par une méthode empirique explique le nombre limité de mutants que nous avons pu étudier.

La sélection de mutants résistants à la glycine constituant un moyen d'obtenir des souches atténuées, nous avons cherché

à préciser le mécanisme d'action de cet acide aminé sur les bactéries tumorigènes. C'est au cours de ce travail que nous avons mis en évidence une nouvelle propriété des bactéries B6. En effet :

1° Les bactéries marquées rapidement par l'uracile ^{14}C puis exposées à la glycine (7.10^{-2}M) solubilisent un constituant initialement présent sous forme acido-insoluble.

2° L'étude des ARN extraits des bactéries marquées rapidement par l'uracile ^{14}C révèle une diminution importante de la radioactivité spécifique des ARN consécutive à l'exposition des bactéries à la glycine.

3° La glycine provoque un arrêt complet des synthèses des ARN (mesurée par l'incorporation de l'uracile ^{14}C).

4° La fraction étudiée se marque de façon exponentielle en fonction du temps. La demi-vie du phénomène est relativement courte ($1/30^{\circ}$ du temps de génération à 30°C). Il s'agit donc d'une fraction à renouvellement rapide. La vitesse de solubilisation (en présence de glycine) est voisine de celle de marquage (en absence de glycine).

5° Les synthèses protéiques (mesurées par l'incorporation du tryptophane ^{14}C) sont arrêtées lorsque les bactéries B6 sont exposées à la glycine.

Les résultats présentés suggèrent que la fraction dont la solubilisation est démasquée durant l'exposition des bactéries à la glycine est essentiellement constituée par les ARN messagers. Il est suggéré que l'effet « primaire » de la glycine soit de provoquer un relâchage de certains ou de la plupart des acides aminés du « pool » de la bactérie. Ce phénomène provoquerait les effets de la régulation dite « stringente » que les acides aminés exercent sur la synthèse des ARN.



BIBLIOGRAPHIE

1. ARONSON (A.I.) et SPIEGELMANN (S.), 1961. — Protein and ribonucleic acid synthesis in a chloramphenicol-inhibited system (*Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 70-84).
2. BEARDSLEY (R.E.), 1955. — Phage production by crown-gall bacteria and the formation of plant tumors (*Amer. Naturalist.*, **89**, 175-176).
3. BEARDSLEY (R.E.), 1960. — Lysogenicity in *Agrobacterium tumefaciens* (*J. Bact.*, **80**, 180-187).
4. BEARDSLEY (R.E.), 1962. — Glycine resistance in *Agrobacterium tumefaciens* (*J. Bact.*, **83**, 6-13).
5. BEARDSLEY (R.E.), 1962. — Amino-acid cross resistance in *Agrobacterium tumefaciens* (*J. Bact.*, **84**, 1237-1240).
6. BEARDSLEY (R.E.), BOHAN (J.), DALY (J.), 1962. — Antibiotic production and glycine resistance in *Agrobacterium tumefaciens* (*J. Bact.*, **84**, 1345).
7. BEAUD (G.), 1961. — Inclusion rapide de pièces histologiques végétales destinées à une étude autoradiographique (*Bull. Micr. Appl.*, **11**, 91-92).
8. BEAUD (G.), 1963. — Dégradation d'un acide nucléique par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.), souche B6, soumise à l'action de la glycine (*C. R. Acad. Sc.*, **257**, 2752-2753).
9. BEAUD (G.), MANIGAULT (P.), STOLL (C.), 1963. — Observations sur des tumeurs végétales incomplètes (*Phytopath. Z.*, **47**, 25-37).
10. BEAUD (G.), MANIGAULT (P.), 1964. — Aspects quantitatifs du rôle de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Towns) dans l'induction tumorale (*Phytopath. Z.*, **51**, 267-273).
11. BERGEY, 1948. — Manuel de détermination Bacteriology, 6^e éd. (Williams et Wilkins Co. Baltimore Ed.).
12. BERNAERTS (M.J.), LEY (J. DE), 1958. — 3-ketoglycosides, new intermediates in the bacterial catabolism of dissacharides (*Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 661-662).
13. BERNAERTS (M.J.), LEY (J. DE), 1960. — Microbiological formation and preparation of 3-ketoglycosides from dissacharides (*J. Gen. Microbiol.*, **22**, 129-136).
14. BERNAERTS (M.J.), LEY (J. DE), 1960. — The structure of 3-ketoglycosides formed from dissacharides by certain bacteria (*J. Gen. Microbiol.*, **22**, 137-146).
15. BERNAERTS (M.J.), LEY (J. DE), 1961. — An improved method for the preparation of 3-ceto-glycosides (*Antonie Van Lævenhoeck*, **27**, 247-256).
16. BERNAERTS (M.J.) et LEY (J. DE), 1963. — A biochemical test for crown-gall bacteria (*Nature*, **197**, 406-407).

17. BERNÄERTS (M.J.), FURNELLE (J.), LEY (J. DE), 1963. — The preparation of some new dissacharides and D-allose from 3-ceto-glycosides (*Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 322-330).
18. BERNFELD (M.), 1960. — Recherches sur les effets de lipides introduits dans certains végétaux supérieurs (*Revue de Cytologie et Biologie Végétales*, **22**, 151-349).
19. BERTHELOT (A.), AMOUREUX (G.), 1938. — Sur la formation d'acide indol-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane (*C. R. Acad. Sc.*, **206**, 537-540).
20. BLACK (L.M.), 1944. — Some viruses transmitted by agallian leafhoppers (*Proc. amer. Philos. Soc.*, **88**, 132-144).
21. BOPP (M.), 1964. — Induction tumorale et son inhibition (*Bull. Soc. Franc. Physiol. Végét.*, **10**, 18-31).
22. BOPP (M.), 1964. — Hemmung der crown-gall Entstehung durch Fluor-desoxyuridin (*Z. Naturforsch.*, **19b**, 64-71).
23. BOPP (M.), 1965. — Time factor in the action of 5-Fluorodeoxyuridine on the development of crown-gall (*Nature*, **207**, 83-84).
24. BRAUN (A.C.), 1943. — Studies on tumor inception in the crown-gall disease (*Amer. J. Bot.*, **30**, 674-677).
25. BRAUN (A.C.), 1947. — Recent advances in the physiology of tumor-formation in the crown-gall disease of plants (*Growth*, **11**, 325-337).
26. BRAUN (A.C.), 1947. — Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall (*Amer. J. Bot.*, **34**, 234-240).
27. BRAUN (A.C.), 1950. — Thermal inactivation studies on the tumor-inducing principle in crown-gall (*Phytopath.*, **40**, 3).
28. BRAUN (A.C.), 1951. — Cellular autonomy in crown-gall (*Phytopath.*, **41**, 963-966).
29. BRAUN (A.C.), 1952. — Conditionning of the host cell as a factor in the transformation process in crown-gall (*Growth*, **16**, 68-74).
30. BRAUN (A.C.), 1954. — Studies on the origin of the crown-gall cell (*Brookhaven Symp.*, **6**, 115-127).
31. BRAUN (A.C.), 1956. — The activation of the two growth substance systems accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown-gall (*Cancer Res.*, **16**, 53-56).
32. BRAUN (A.C.), 1956. — A study on the nature of autonomy in neoplastic plant cells (*Amer. Naturalist.*, **90**, 227-236).
33. BRAUN (A.C.), 1957. — A physiological study on the nature of autonomous growth in neoplastic plant cells (*Soc. Exper. Biol. Symp.*, **XI**, The biological action of growth substances, 132-142).
34. BRAUN (A.C.), 1959. — A demonstration of the recovery of the crown gall-tumor cell with the use of complex tumors of single cell origin (*Proc. N. A. S.*, **45**, 932-938).
35. BRAUN (A.C.), LASKARIS (T.), 1942. — Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth promoting substances (*Proc. N. A. S.*, **28**, 468-477).
36. BRAUN (A.C.), WHITE (P.R.), 1943. — Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors (*Phytopath.*, **33**, 85-100).
37. BRAUN (A.C.), STONIER (T.), 1958. — Morphology and physiology of plant tumors (*Protoplasmatologia*, **10**, 5a, 1-93).
38. BRAUN (A.C.), WOOD (H.N.), 1962. — On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* [*Proc. N. A. S.*, **48**, 1176-1182).

39. BROWN (J.G.), GARDNER (F.E.), 1936. — Galls produced by plant hormones including a hormone extracted from *Bacterium tumefaciens* (*Phytopath.*, **26**, 708-713).
40. CAMUS (G.), GAUTHERET (R.-J.), 1948. — Sur la transmission par greffage des propriétés tumorales des tissus de crown-gall (*C. R. Soc. Biol.*, **142**, 15-16).
41. CAMUS (G.), WILDMANN (S.G.), BONNER (J.), 1948. — Comparative study of the soluble proteins of crown-gall and normal tissues of sunflower cultivated *in vitro* (*Amer. Inst. Biol. Sci. Bull.*, **1**, 34).
42. CHANG (Y.F.), FEINGOLD (D.S.), 1965 (abstr.). — Aldohexuronic acid utilisation by *Agrobacterium tumefaciens* (*Bacteriol. Proc.*, p 58).
43. CHARGAFF (E.), LEVINE (M.), 1936. — Chemical composition of *Bacterium tumefaciens* (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **34**, 675-677).
44. CHARGAFF (E.), LEVINE (M.), 1938. — The lipids of *Bacterium tumefaciens* (*J. Biol. Chem.*, **124**, 195-205).
45. CHESTER (K.S.), 1933. — Studies on bacteriophage in relation to phytopathogenic bacteria (*Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, **89**, 1-30).
46. COHEN (G.), 1963. — Isolement de mutants biochimiques [*Techniques de Laboratoire*, Masson et C^{ie} (Paris), 489-491].
47. CONN (H.J.), DARROW (M.A.). — Staining Procedures [*Biotech. Publications*, Geneva N.Y (U.S.A.), 2^e ed.].
48. CONNER (H.A.), RIKER (A.J.), PETERSON (W.H.), 1937. — The carbon metabolism of the crown-gall and hairy-root organism. (*J. Bact.*, **34**, 221-235).
49. DAVIS (B.D.), 1948. — Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by Penicillin (*J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 4267).
50. Mc EWEN (D.M.), 1952. — Cancerous response in plants (*Nature*, **169**, 839).
51. Mc FALL (E.), MANDELSTAM (J.), 1963. — Specific metabolic repression of induced enzymes in *Escherichia coli* (*Nature*, **197**, 880-881).
52. FAN (D.P.), HIGA (A.H.), LEVINthal (C.), 1964. — Messenger RNA decay and protection (*J. Mol. Biol.*, **8**, 210-222).
53. FEINGOLD (D.S.), DURBIN (R.), 1961 (*Amer. Chem. Soc. Abstracts*, **140**, 3D).
54. FRAENKEL-CONRAT (H.), SINGER (B.), TSUGITA (A.), 1961. — Purification of viral RNA by means of bentonite (*Virology*, **14**, 54-58).
55. FRASER (J.H.), 1961. — Use of polyethylene-glycol in biology (*Nature*, **189**, 241-242).
56. FUKUI (S.), 1965. — Transformation of glucose to 3-ceto-glucose by cells of *Agrobacterium tumefaciens* (*Biochem. Biophys. Res. Com.*, **18**, 186-191).
57. FUKUI (S.), HOCHSTER (R.M.), 1963. — Conversion of dissacharides to the corresponding glycoside-3-uloses by intact cells of *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 2363-2371).
58. FUKUI (S.), HOCHSTER (R.M.), DURBIN (R.), GREBNER (E.E.), FEINGOLD (D.S.), 1963 [*Bull. Res. Council Israel* (Restria Memorial Issue), **11** A4, 262].
59. GAUTHERET (R.J.), 1946. — Comparaison entre l'action de l'acide indoleacétique et celle du *Phytomonas tumefaciens* sur la croissance des tissus végétaux (*C. R. Soc. Biol.*, **140**, 169-171).
60. GAUTHERET (R.J.), 1947. — Existe-t-il un cancer des plantes ? (Université de Paris, Conférence au Palais de la Découverte, Paris, France).
61. GAUTHERET (R.J.), 1952. — Cancer végétal et culture de tissus (*Rev. Path. Comp. et Hyg. Gén.*, **52**, 100-120).

62. GAUTHERET (R.J.), 1959. — La culture des tissus végétaux (Masson et C^{ie}, éd., 863 p.).
63. GEIGER JR. (G.B.), ANDERSON (R.J.), 1939. — The chemistry of *Phytomonas tumefaciens*. I. The lipids of *Phytomonas tumefaciens*. The composition of phosphatides (*J. Biol. Chem.*, **129**, 519-529).
64. GIERER (A.), SCHRAMM (G.), 1956. — Infectivity of ribonucleic acid from Tobacco Mosaic Virus (*Nature*, **177**, 702-703).
65. GOLDFINE (H.), ELLIS (M.E.), 1964. — N-methyl groups in bacterial lipids (*J. Bact.*, **87**, 8-15).
66. GORDON (M.), 1959. — Genetic and correlated studies of normal and atypical pigment cell growth (*Growth*, **10**, 153-219).
67. GREBNER (E.E.), DURBIN (R.), FEINGOLD (D.S.), 1964. — Formation de β -D-fructofuranosyl- α -D-ribohexopyranoside-3-ulose by a *Micrococcus* sp. (*Nature*, **201**, 419-420).
68. GREBNER (E.E.), FEINGOLD (D.S.), 1965. — D-aldo hexopyranoside deshydrogenase of *Agrobacterium tumefaciens* (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **19**, 37-42).
69. GRIBNAU (A.G.M.), 1965. — Onderzœkingen over plantentumoren crown-gall [Thèse, Leiden, **110** p. (Résumé en anglais)].
70. GROS (F.), GROS (F.), 1958. — Rôle des acides aminés dans la synthèse des acides nucléiques chez *Escherichia Coli* (*Exper. Cell Res.*, **14**, 104-131).
71. HALL (B.D.), DOTY (P.), 1959. — The preparation and physical-chemical properties of ribonucleic acid from microsomal particles (*J. Mol. Biol.*, **1**, 111-126).
72. HELLER (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro* [Thèse (Paris), 233 p., et *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.*, **14**, p. 1-223].
73. HENDRICKSON (A.A.), BALDWIN (I.L.), RIKER (A.J.), 1934. — Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhyzogenes* and *Bacillus radiobacter* (*J. Bact.*, **28**, 597-618).
74. HILDEBRANDT (E.M.), 1942. — A micurgical study of crown-gall infection in tomato (*J. Agricult. Res.*, **65**, 45-59).
75. HOCHSTER (R.M.), CHANG (W.M.), 1963. — Deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid synthesis in the crown-gall tumor inducing organism *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1503-1518).
76. HOHL (H.R.), 1960. — Über die submikroskopische Struktur normaler und hyperplastischer Gewebe von *Datura stramonium* L. 1. Teil. Normalgewebe (*Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **70**, 395-439).
77. HOFMANN (K.), TAUSIG (F.), 1955. — On the identity of Phytomonic acid and Lactobacillic acid. A reinvestigation of the fatty acid spectrum of *Agrobacterium (Phytomonas) tumefaciens* (*J. Biol. Chem.*, **213**, 425-432).
78. HOFMANN (K.), JUCKER (O.), MILLER (W.R.), YOUNG (A.C.), TAUSIG (F.), 1957. — On the structure of lactobacillic acid (*J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1799-1804).
79. HUG (R.), LIEFSON (E.), 1953. — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria (*J. Bact.*, **66**, 24-26).

80. HURWITZ (J.), FURTH (J.J.), MALAMY (M.), ALEXANDER (M.), 1962. — The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis of RNA and DNA by actinomycin D and proflavin (*Proc. N. A. S.*, **48**, 1222-1230).
81. Mc INTIRE (F.C.), RIKER (A.J.), PETERSON (W.H.), 1941. — The role of certain vitamins and metallic elements in the nutrition of the crown-gall organism (*J. Bact.*, **42**, 1-13).
82. Mc INTIRE (F.C.), PETERSON (W.H.), RIKER (A.J.), 1942. — A polysaccharide produced by the crown-gall organism (*J. Biol. Chem.*, **143**, 491-496).
83. JENSEN (C.O.), 1910. — Von echten Geschwülsten bei Pflanzen. Deuxième Conférence internat. pour l'étude du cancer [Rapport (Paris), p. 243-254, in *Den Kgl. Veterinaer-og Landbohojskoles Serumlab.*, VII].
84. JENSEN (C.O.), 1918. — Undersogelser vedrorende nogle svulstlignende dannelser hos planter (*Den Kgl. Veterinaer-og Landbohojskoles Aarskrift*, 91-143).
85. KANESHIRO (T.), MARR (A.G.), 1962. — Phospholipids in *Azotobacter agilis*. *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* (*J. Lipid. Res.*, **3**, 184-189).
86. KANESHIRO (T.), LAW (J.H.), 1964. — Phosphatidylcholine synthesis in *Agrobacterium tumefaciens* I Purification and Properties of a phosphatidyl-ethanolamine-N-methyl transferase (*J. Biol. Chem.*, **239**, 1705-1713).
87. KAPER (J.M.), VELDSTRA (K.), 1958. — On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens* (*Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 401-420).
88. KATZNELSON (H.), 1955. — Metabolism of phytopathogenic bacteria. I Comparative Studies on the metabolism of representative species (*J. Bact.*, **70**, 469-475).
89. KATZNELSON (H.), 1958. — Metabolism of phytopathogenic bacteria. II Metabolism of carbohydrates by cell-free extracts (*J. Bact.*, **75**, 540-543).
90. KENT (G.C.), 1937. — Some physical chemical and biological properties of a specific bacteriophage for *Pseudomonas tumefaciens* (*Phytopath.*, **27**, 871-902).
91. KEPES (A.), 1965. — Cinétique de synthèse et d'inactivation de l'ARN messager spécifique de la β -galactosidase. Colloques internationaux du C.N.R.S., Marseille, 1963 [*Ed. du C.N.R.S. (Paris)*, **124**, 73-89].
92. KI YONG LEE, WAHL (R.), BARBU (E.), 1956. — Contenu en bases puriques et pyrimidiques des ADN bactériens (*Ann. de l'Institut Pasteur*, **91**, 212-224).
93. KLEIN (R.M.), 1955. — Resistance and susceptibility of carrot roots to crown-gall tumor formation (*Proc. N. A. S.*, **41**, 271-274).
94. KLEIN (R.M.), 1958. — Activation of metabolic systems during tumor cell formation (*Proc. N. A. S.*, **44**, 350-354).
95. KLEIN (R.M.), LINK (R.K.), 1952. — Auxin as promoting agent in the transformation of normal to tumors cells (*Proc. N. A. S.*, **38**, 1066-1072).
96. KLEIN (R.M.), LINK (G.K.K.), 1955. — The etiology of crown-gall (*Quart. Rev. Biol.*, **30**, 207-277).
97. KLEIN (R.M.), BRAUN (A.C.), 1960. — On the presumed sterile induction of plant tumors (*Science*, **131**, 1612).

98. KLEMMER (H.W.), RIKER (A.J.), ALLEN (O.N.), 1955. — Inhibition of crown-gall by selected antibiotics (*Phytopath.*, **45**, 618-625).
99. KOSTOFF (D.), 1930. — Tumors and others malformations on certain *Nicotiana* hybrids (*Zbl. Bakter. Abt II*, **81**, 244-260).
100. KUPILA (S.), 1963. — Crown-gall as an anatomical and cytological problem: A review (*Cancer Res.*, **23**, 497-509).
101. KURLAND (C.G.), MAALOE (O.), 1962. — Regulation of ribosomal and transfert RNA synthesis (*J. Mol. Biol.*, **4**, 193-210).
102. LANDMANN (O.E.), HELLE (S.), 1963. — Enzymically an physically induced inheritance changes in *Bacillus subtilis* (*J. Mol. Biol.*, **7**, 721-738).
103. LARK (C.), LARK (K.G.), 1961. — Studies on the mechanism by wich D-amino acids block cell wall synthesis (*Biochem. Biophys. Acta*, **49**, 308-322).
104. LAW (J.H.), ZALKIN (H.), KANESHIRO (T.), 1963. — Transmethylation reactions in bacterial lipids (*Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 143-151).
105. LEDERBERG (J.), ZINDER (N.), 1948. — Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin (*J. Am., chem. Soc.*, **70**, 4267).
106. LEVINE (M.), 1922. — Studies on plant cancers. — IV. The effects of inoculating various quantities of differents dilutions of *Bacterium tumefaciens* into the tobacco plant (Abstr.) (*Phytopath.*, **12**, 56).
107. LEVINE (M.), CHARGAFF (E.), 1937. — The response of plants to chemical fractions of *Bacterium tumefaciens* (*Am. J. Botany*, **24**, 461-472).
108. LEVINTHAL (C.), KEYNAN (A.), HIGA (A.), 1962. — Messenger RNA turnover and protein synthesis in *Bacillus subtilis* inhibited by actinomycin D (*Proc. N. A. S.*, **48**, 1631-1638).
109. LEY (J. DE), 1964. — Effect of mutation on DNA composition of some bacteria (*Antonie van Leenwenhæk*, **30**, 281-288).
110. LIORET (C.). — Essai d'une conception générale du phénomène tumoral chez les végétaux. (Communication personnelle.)
111. LIPETZ (J.), 1965. — Crown-gall tumorigenesis: Effect of temperature on wound healing and conditioning (*Science*, **49**, 865-866).
112. LIPPINCOTT (J.A.), HEBERLEIN (G.T.), 1965. — The induction of leaf tumors by *Agrobacterium tumefaciens* (*Amer. J. Bot.*, **52**, 396-403).
113. LIPPINCOTT (J.A.), LIPPINCOTT (B.B.), 1965. — *Agrobacterium tumefaciens*: Thermal inactivation of tumor-inducing ability (*Science*, **147**, 1578-1579).
114. LIPPINCOTT (B.B.), LIPPINCOTT (J.A.). (Communication personnelle.)
115. LISON (L.), 1958. — Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats (Gauthier-Villars, Ed., Paris).
116. LOCKE (S.B.), RIKER (A.J.), DUGGAR (B.M.), 1938. — Growth substance and the development of crown-gall (*J. Agric. Res.*, **57**, 21-39).
117. LOCKE (S.B.), RIKER (A.J.), DUGGAR (B.M.), 1939. — Production of growth substance on peptone broth by crown-gall bacteria and related non gall forming organisms (*J. Agr. Res.*, **59**, 519-525).
118. LONGLEY (B.J.), BERGE (T.O.), VAN LANEN (J.M.), BALDWIN (I.L.), 1937. — Changes in the infective ability of *Rhizobia* and *Phytomonas tumefaciens* induced by culturing on media containing glycine (*J. Bact.*, **33**, 29).
119. MADSEN (N.B.), 1961. — The occurence and enzymic synthesis of glycogen in extracts of *Agrobacterium tumefaciens* (*Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 194-195).

120. MADSEN (N.B.), 1961. — The inhibition of glycogen phosphorylase by uridine-diphosphate glucose (*Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **6**, 310-313).
121. MADSEN (N.B.), 1962. — Periodation of the glucan of *Agrobacterium tumefaciens* with recovery of cleavage products (*Analytical Biochemistry*, **4**, 509-511).
122. MADSEN (N.B.), 1963. — The biological control of glycogen metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 561-571).
123. MAGROU (J.), 1926. — Sur l'anatomie du cancer des plantes ou crown-gall (*C. R. Acad. Sci.*, **183**, 986-988).
124. MANIGAULT (P.), 1964. — La transformation tumorale (*Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **10**, 3-17).
125. MANIGAULT (P.), SALMON (J.), 1956. — Microradiographie des tissus de la plante au cours de la phase de conditionnement dans l'initiation d'une tumeur expérimentale (*J. Rech. C.N.R.S.*, **37**, 319-327).
126. MANIGAULT (P.), SALMON (J.), ROUSSEAU (M.), 1959. — Etude comparée du tissu tumoral des plantes et du tissu normal par spectro-microscopie de fluorescence (*Bull. Microsc. Appl.*, **9**, 10-19).
127. MANIGAULT (P.), STOLL (Ch.), 1960. — Induction et croissance de tumeurs végétales exemptes de bactéries (*Phytopath. Z.*, **38**, 1-12).
128. MANIGAULT (P.) et BEAUD (G.), 1963. — Sur certains des caractères distinctifs de mutants avirulents provenant d'une souche virulente d'*Agrobacterium tumefaciens* (*C. R. Acad. Sci.*, **256**, 2469-2470).
129. NOMURA (M.), 1964. — Mechanism of action of colicines (*Proc. N. A. S.*, **52**, 1514-1521).
130. NOMURA (M.), NAKAMURA (M.), 1962. — Reversibility of inhibition of nucleic acids and protein synthesis by colicin K (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7**, 306-309).
131. NOVICK (A.), SZILARD (L.), 1954. — Experiments with the chemostat on the rate of amino acid synthesis in bacteria (*In Dynamics of Growth Processus*, p. 21; Princetown University Press).
132. PARK (J.T.), 1958. — Inhibition of cell-wall synthesis in *Staphylococcus aureus* by chemicals which cause accumulation of wall precursors (*Biochem. J.*, **70**, 2P).
133. PARTANEN (C.R.), 1958. — Quantitative technic for analysis of radiation induced tumors (*Science*, **128**, 1006-1007).
134. PICCI (G.), 1960. — Osservazioni morfo-fisiologiche su *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.) Conn Normale et antibiotico resistente (*Annali della Facoltà d'Agraria*, **21**, 19-29).
135. PILET (P.E.), 1961. — Phytohormones de croissance (Masson, éd.).
136. PUTMAN (E.W.), POTTER (A.L.), HOGDSON (R.), MASSID (W.Z.), 1950. — The structure of crown-gall polysaccharide (*J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 5024-5029).
137. REEVES (R.E.), 1944. — The optical activity of the copper complexes of polysaccharides and substituted methylglucosides (*J. Biol. Chem.*, **154**, 49-55).
138. RIKER (A.J.), 1923. — Some relations of the crown-gall organism to its host-tissue (*J. Agric. Res.*, **25**, 119-132).
139. RIKER (A.J.), 1927. — Cytological studies of crown-gall tissue (*Am. J. Bot.*, **14**, 25-37).

140. ROBERTS (R.B.), ABELSON (P.H.), COWIE (D.), BOLTON (E.T.), BRITTEN (R.J.), 1955. — Studies of biosynthesis in *Escherichia Coli* (*Carnegie Inst. Wash. Publ.*, **607**, Washington D.C.).
141. ROPP (R.S. DE), 1947. — The response of normal plant tissues and of crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones (*Amer. J. Bot.*, **34**, 53-62).
142. ROPP (R.S. DE), 1947. — The growth promoting and tumefacient factors of bacteria-free crown-gall tumor tissue (*Amer. J. Bot.*, **34**, 248-261).
143. ROPP (R.S. DE), 1948. — Tumor formation on stem fragments *in vitro* (*Canc. Res.*, **8**, 519-530).
144. RUBIO-HUERTOS (M.), MARTINEZ DE VELASCO (R.B.), 1962. — Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens* (*Nature*, **195**, 101).
145. RYTER (A.), MANIGAUULT (P.), 1964. — Etude au microscope électronique de la formation de tumeurs provoquées par *Agrobacterium tumefaciens* chez le topinambour (*Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **10**, 44-56.)
146. SAHAI SRIVASTA, 1964. — Investigations on the occurrence and biosynthesis of indolepyruvic acid in plant tissues and bacteria (*Plant Physiology*, **39**, 781-785).
147. SCHNEIDER (W.C.), 1946. — Phosphorus compounds in animal tissues. — III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids (*J. Biol. Chem.*, **164**, 747-751).
148. SMITH (E.F.), TOWNSEND (C.O.), 1907. — A plant tumor of bacterial origin (*Science*, **25**, 671-673).
149. SMITH (E.F.), TOWNSEND (C.O.), 1907. — Ein Pflanzentumor bakteriellen Ursprungs (*Cbl. Bakter. usw. Abt. II*, **20**, 89-91).
150. SNEDECOR (G.W.), 1956. — Statistical methods [*The Iowa State University Press*, Ames, Iowa (U.S.A.), 5^e éd.].
151. SOFFER (R.L.), GROS (F.), 1964. — Effects of dinitrophenol and proflavine on information transfer mechanism in *E. coli*: a study *in vitro* and *in vivo* (*Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 423-439).
152. STEIN (O.L.), SPARROW (A.H.), SCHAIRER (L.A.), 1959. — Leaf tumors induced in *Graptopetalum paraguayense* by gamma radiation (*Cancer Res.*, **19**, 746-748).
153. STENT (G.S.), BRENNER (S.), 1961. — A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis (*Proc. N. A. S.*, **47**, 2005-2014).
154. STONIER (T.), 1956. — Radioautographic evidence for the intercellular location of crown-gall bacteria (*Amer. J. Bot.*, **43**, 647-655).
155. STONIER (T.), 1960. — *Agrobacterium tumefaciens* Conn. I. Release of ³²P and ³⁵S by labeled bacteria *in vitro* (*J. Bact.*, **79**, 880-888).
156. STONIER (T.), 1960. — *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II - Production of an antibiotic substance (*J. Bact.*, **79**, 889-898).
157. STROMINGER (J.L.), 1962. — Biosynthesis of bacterial cell walls [*The Bacteria*, vol. III: *Biosynthesis*; Academic Press (N.Y.)].
158. SUKANYA (N.K.), VAIDYNATHAN (C.S.), 1964. — Aminotransferases of *Agrobacterium tumefaciens*. Transamination between tryptophan and phenylpyruvate (*Biochem. J.*, **92**, 594-597).
159. SUZUKI (T.), HOCHSTER (R.M.), 1964. — Pseudo-uridine from culture media of *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. of Microbiology*, **10**, 867-875).

160. THOMAS (J.E.), RIKER (A.J.), 1948. — The effects of representative plant growth substances upon attenuated bacterial crown-galls (*Phytopath.*, **38**, 26).
161. UMBARGER (H.E.), 1956. — Evidence for a negative-feedback mechanism in the synthesis of isoleucine (*Science*, **123**, 848).
162. VAN LANEN (J.M.), BALDWIN (I.L.), RIKER (A.J.), 1940. — Attenuation of cell stimulating bacteria by specific amino-acids (*Science*, **92**, 512-513).
163. VAN LANEN (J.M.), BALDWIN (I.L.), RIKER (A.J.), 1952. — Attenuation of crown-gall bacteria by cultivation in media containing glycine (*J. Bact.*, **63**, 715-721).
164. VAN LANEN (J.M.), BALDWIN (I.L.), RIKER (A.J.), 1952. — The effect of amino-acids and related compounds upon the growth, virulence and enzyme activity of crown-gall bacteria (*J. Bact.*, **63**, 723-734).
165. VARDANIS (A.), HOCHSTER (R.M.), 1961. — Adenine nucleotide breakdown and its relationship to polynucleotide phosphorylase in the crown-gall tumor-inducing organism *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 773-785).
166. VARDANIS (A.) et HOCHSTER (R.M.), 1961. — On the mechanism of glucose metabolism in the plant tumor inducing organism *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1165-1182).
167. VARDANIS (A.), HOCHSTER (R.M.), 1961. — On the nucleotide specificity of the polynucleotide phosphorylase of the crown-gall tumor-inducing organism *Agrobacterium tumefaciens* (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1695-1704).
168. VELICK (S.F.), 1944. — The chemistry of *Phytomonas tumefaciens*: III. Phytomonic Acid, a new branched chain fatty acid (*J. Biol. Chem.*, **152**, 533-538).
169. VELICK (S.F.), 1944. — The chemistry of *Phytomonas tumefaciens*: IV. Concerning the structure of phytomonic acid (*J. Biol. Chem.*, **156**, 101-107).
170. VELICK (S.F.), ANDERSON (R.J.), 1944. — The chemistry of *Phytomonas tumefaciens*: II. The composition of the acetone-soluble fat (*J. Biol. Chem.*, **152**, 523-532).
171. WHITE (P.R.) et BRAUN (A.C.), 1942. — A Cancerous néoplasm of plants. Autonomous bacteria-free crown-gall tissue (*Cancer Res.*, **2**, 597-617).
172. WOOD (H.N.), BRAUN (A.C.), 1961. — Studies on the regulation of certain essential biosynthetic systems in normal and crown-gall tumor cells (*Proc. N. A. S.*, **47**, 1907-1913).
173. YATES (R.A.), PARDEE (A.B.), 1956. — Control of pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli* by a feedback mechanism [*J. Biol. Chem.*, **221**, 757-770).
174. ZAJIC (J.E.), 1959. — Hexuronic deshydrogenase of *Agrobacterium tumefaciens* (*J. Bact.*, **78**, 734-735).

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

*Mécanismes du fonctionnement des horloges circadiennes,
à la faveur des acquisitions récentes sur les processus de régulation*

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 Janvier 1966

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE.

Imp. P. Oudin, Poitiers
Dépôt légal 1966, n° 463
